

Aus der Klinik für Neurologie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Einfluss der sauren Sphingomyelinase auf die Makrophagenaktivierung durch Alzheimer Amyloid Protein

Dissertation zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von: Timo Boch

geb. am: 17. 07. 1981 in Lindenfels

Ich widme diese Arbeit der Familie Boch.

*Herrn Prof. Dr. Faßbender, Herrn Dr. Liu und Herrn Dipl.-Biol. Xie danke ich vielmals
für die Unterstützung und Betreuung.*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen	VI
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1. Alzheimer-Krankheit	4
2.1.1. Demenz und das Alter	4
2.1.2. Alzheimer-Pathologie	5
2.1.2.1. Amyloid-Plaques	6
2.1.2.2. Neurofibrillen	7
2.2. Neuroinflammation	8
2.2.1. MCP-1	9
2.2.2. TNF- α	9
2.3. <i>Membrane rafts</i>	10
2.3.1. Sphingolipidstoffwechsel	11
2.3.1.1. Saure Sphingomyelinase (ASM)	13
2.3.1.2. Proteinkinase B / Akt	15
2.4. Toll-like-Rezeptor-Ligand Pam3CSK4	15
2.5. Fragestellung	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Geräte	17
3.1.2. Chemikalien, Enzyme, Kits	17
3.1.3. Gebrauchsmaterialien	19
3.2. Methoden	20
3.2.1. RNA-Interferenz (RNAi)	20
3.2.2. Plasmidvektor	22
3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	22

3.2.4. Insertionskontrolle der Plasmidvektoren per Elektrophorese	23
3.2.5. Transfektion in THP-1-Zellen	23
3.2.6. Zellkulturarbeit	24
3.2.7. Fluoreszenzmikroskopie	24
3.2.8. Zelllysate.....	24
3.2.9. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)	25
3.2.10. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
3.2.11. Western Blot.....	28
3.2.12. Sphingomyelinase-Aktivitätstest.....	29
3.2.13. ELISA	30
3.2.14. Statistik	31
4. Ergebnisse	32
4.1. Insertionskontrolle der Plasmidvektoren	32
4.2. Fluoreszenzmikroskopie.....	33
4.3. RT-qPCR	35
4.4. Western Blot	37
4.5. Sphingomyelinase-Aktivitätstest	40
4.6. ELISA	40
4.6.1. TNF- α	41
4.6.2. MCP-1	42
5. Diskussion	43
5.1. Fragestellung Nr. 1	43
Zellen und Kontrollstimulanz	43
Reduktion der ASM- bzw. Akt1-Expression	44
5.2. Fragestellung Nr. 2	45
TNF- α	46
MCP-1.....	47
5.3. Fragestellung Nr. 3	48
TNF- α	48
MCP-1.....	48
5.4. Schlussfolgerung	50

6. Literaturverzeichnis.....	51
7. Abbildungsverzeichnis.....	57
8. Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungen

AICD	Amyloid precursor protein intracellular domain
APP	Amyloid-Precursor-Protein
ASM	Saure Sphingomyelinase
A β	Amyloid- β
BACE	Beta-site of APP cleaving enzyme
BSA	Rinderserum-Albumin
CO ₂	Kohlendioxid
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
FCS / FBS	Fetales Kälber- / Rinderserum
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
GLUT4	Glucose-Transporter 4
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IDE	Insulin degrading enzyme
k. d.	Knock-down
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Monozyten-anlockendes Protein
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
miRNA	micro-RNA
mRNA	messenger-RNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam3CSK4	Tripalmitoyl-cysteinyl-seryl-tetralysine
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphat bufferd saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RISC	RNA-induced-silencing-complex
RNA	Riboneukleinsäure
RNAi	RNA-Inteferenz
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SM	Sphingomyelin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepuffertes Salz
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Einfluss der sauren Sphingomyelinase auf die Makrophagenaktivierung durch Alzheimer Amyloid Protein.

Das zentrale histopathologische Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit sind intrazerebrale Plaques, welche hauptsächlich aus Amyloid- β bestehen. Sie sind in der Lage im Gehirn ortsständige Makrophagen zu aktivieren, was eine Entzündungsreaktion auslöst. Diese Neuroinflammation ist Teil der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit. Ein Stellglied dieser Entzündungsreaktion ist wahrscheinlich die saure Sphingomyelinase (ASM), welche die Membranstruktur verändert und hierdurch eine Aktivierungskaskade startet. Zusätzlich wurde die Proteinkinase B / Akt untersucht, welche ebenfalls ein Stellglied der Entzündungskaskade zu sein scheint.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde in THP-1-Zellen experimentell die Aktivität der ASM beziehungsweise Proteinkinase B mittels RNA-Interferenz vermindert, was mittels Fluoreszenzmikroskopie, Western Blotting und PCR nachgewiesen wurde. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Zellen mit Amyloid- β stimuliert und als Entzündungsmarker die Zytokine TNF- α und MCP-1 mittels ELISA bestimmt.

Zwischen den Zellen mit normaler und reduzierter ASM-Aktivität konnte unter den gegebenen Bedingungen kein Unterschied bei der TNF- α -Freisetzung beobachtet werden. Die MCP-1-Freisetzung dagegen war bei einer Hemmung der sauren Sphingomyelinase höchst signifikant reduziert.

Eine reduzierte Akt1-Aktivität erbrachte signifikant gesteigerte TNF- α -Werte, sogar wenn die Zellen nicht stimuliert wurden. Die MCP-1-Werte bei Akt1-k.d. waren ohne Zellstimulation signifikant reduziert, stiegen unter Stimulation aber an. Eine Reduktion der Akt1-Aktivität in den Zellen führte auch zu einer Reduktion der ASM-Aktivität.

Somit gibt es Hinweise für eine den Zytokin-Ausstoß supprimierende Wirkung sowohl der sauren Sphingomyelinase als auch der Proteinkinase B / Akt, da deren Hemmung zu einer gesteigerten Zytokin-Freisetzung führte. Die abweichenden TNF- α -Werte bei ASM-k.d. kann auf die Dauer der Stimulation und den Messzeitpunkt zurückgeführt werden. Insgesamt gibt die Arbeit relevante neue Informationen über die regulierende Rolle der sauren Sphingomyelinase in der Neuroinflammation durch Alzheimer Amyloid Protein.

1. Summary

Effect of the acid sphingomyelinase on activation of macrophages by Alzheimer Amyloid Protein.

The pivotal histopathological hallmark of Alzheimer-disease are intracerebral plaques which mainly consist of Amyloid- β . These intracerebral plaques are able to activate brain macrophages and thereby an inflammatory response is induced. This Neuroinflammation is part of the pathogenesis of Alzheimer-disease. An actuator of this inflammatory response probably is the acid sphingomyelinase (ASM), which changes the structure of the cell membrane and thereby causes an activation cascade. Because it appears to be an actuating factor of inflammatory cascade, too, furthermore the Proteinkinase B / Akt was examined.

In this study at first the activity of ASM respectively Proteinkinase B experimentally was reduced in THP-1-cells by using RNAi. This was detected by means of fluorescence microscopy, Western blotting and PCR. In the subsequent part of the study, cells were stimulated by Amyloid- β , then the cytokines TNF- α and MCP-1 as inflammatory markers were measured by ELISA.

There was no difference in TNF- α -release between cells with normal and reduced ASM-activity found, while at the same time MCP-1 was significantly reduced if the acid sphingomyelinase was knocked down.

Reduced Akt-activity effects raised values of TNF- α , even when the cells were not stimulated. MCP-1 levels in Akt-k.d.-cells were reduced without cell stimulation but could be raised with stimulation. Decreased Akt-activity in the cells leads to a reduction of ASM-activity.

Therefore there are indices for a cytokine release suppressing effect both the acid sphingomyelinase and Proteinkinase B / Akt, because a knock down of these enzymes leads to raised cytokine values. The differing results of TNF- α at ASM-k.d. were ascribed as a duration of stimulation and measuring time points.

Overall this work reveals new relevant informations about the modulating character of the acid sphingomyelinase in neuroinflammation by Alzheimer Amyloid Protein.

2. Einleitung

2.1. Alzheimer-Krankheit

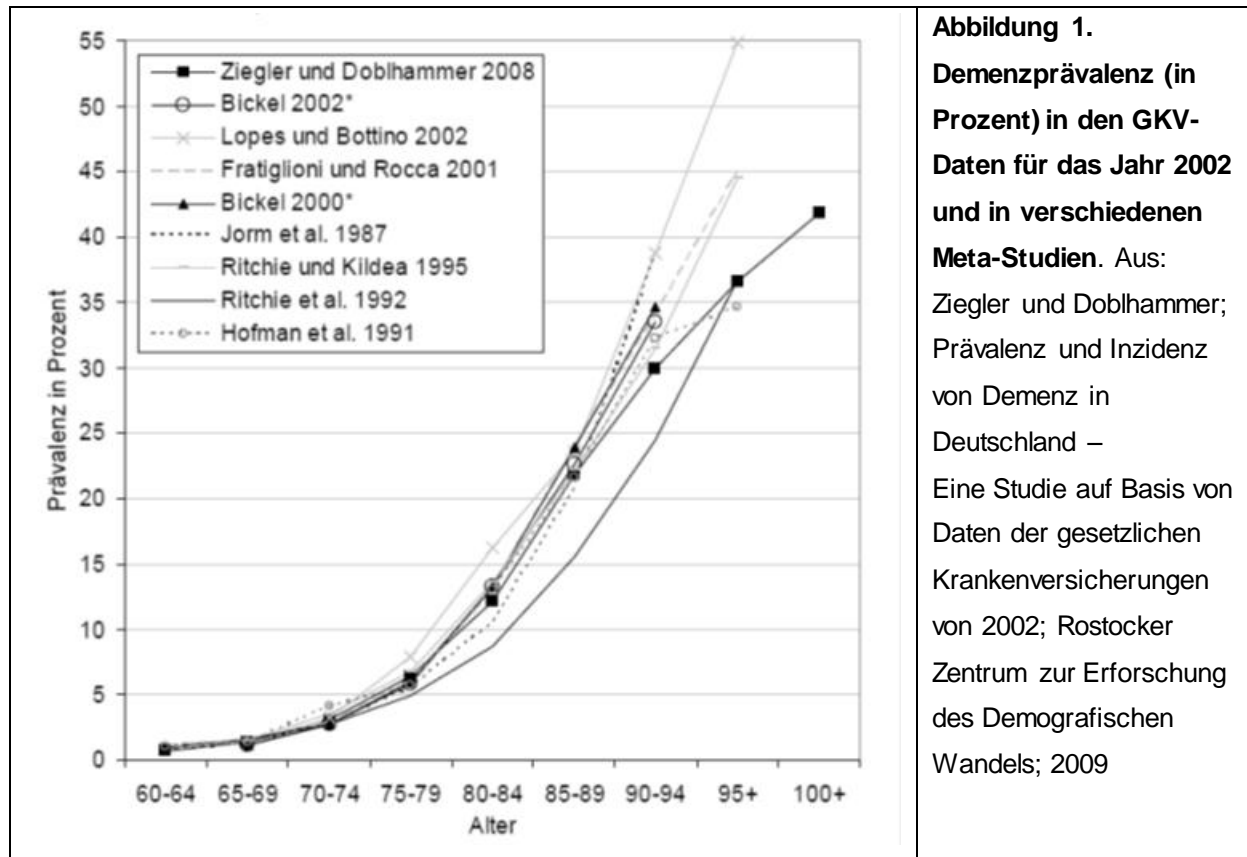
Nach Internationaler Klassifikation der Krankheiten handelt es sich bei der Demenz vom Alzheimer-Typ um eine primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ätiologie und charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen. Sie beginnt meist schleichend und entwickelt sich langsam, aber stetig über einen Zeitraum von mehreren Jahren (1). Klinische Symptome sind Gedächtnisstörungen, Verlust des visuell-räumlichen Denkens, Sprachdefizite, Apraxie und die reduzierte Fähigkeit, Gegenstände, Bilder oder Gesichter, wie die der Familienangehörigen, zu erkennen. Hinzu kommen psychiatrische Begleitsymptome wie Depressionen, Wahnsymptome, Angst, Unruhe, Schlafstörungen, Agitiertheit und Apathie. Der Verlauf und das Auftreten der verschiedenen Krankheitszeichen sind variabel, jedoch ist stets eine Progredienz zu beobachten (2). Die mediane Überlebenszeit nach Auftreten einer Demenz beträgt 4,6 Jahre für Frauen und 4,1 Jahre für Männer (3).

2.1.1. Demenz und das Alter

Weltweit lebten 2001 rund 24 Millionen Menschen über 60 Jahre mit Demenzen, die Zahl wird sich ungefähr alle 20 Jahre verdoppeln (4). In Deutschland leiden zurzeit ca. 1 Millionen Menschen an Demenz, 50 – 70 Prozent davon gehören zur Demenz vom Alzheimer Typ (5) (6). Während weniger als 1 Prozent der unter 65-Jährigen an Alzheimer-Demenz erkrankt sind, verdoppelt sich die Rate bei über 65-Jährigen ungefähr alle 5 Jahre, sodass ca. 10 Prozent der über 80-, 20 Prozent der über 85- und 30 – 40 % der über 90-Jährigen betroffen sind (7).

2008 war ein Fünftel der Deutschen über 65 Jahre, 2060 wird es ein Drittel sein, die Zahl der über 80 Jährigen wird sich mehr als verdoppeln (8). Da Alzheimer vor allem eine Krankheit des Alters ist, werden sich die Gesundheitsausgaben für Demenz von derzeit ca. 8,5 Milliarden Euro pro Jahr stark erhöhen und eine Herausforderung für das Gesundheitssystem darstellen (9).

Hinzu kommen noch die im privaten Bereich entstehenden, nicht erfassbaren Belastungen durch Arbeitszeitausfälle für die Pflege von Familienangehörigen sowie die psychische Beanspruchung und nicht zuletzt der Krankheitsverlauf für den Betroffenen selbst.



2.1.2. Alzheimer-Pathologie

Es gibt zwei wesentliche histopathologische Merkmale der Alzheimer-Krankheit:

- extrazelluläre Amyloid-Plaques und
- intrazelluläre Neurofibrillen.

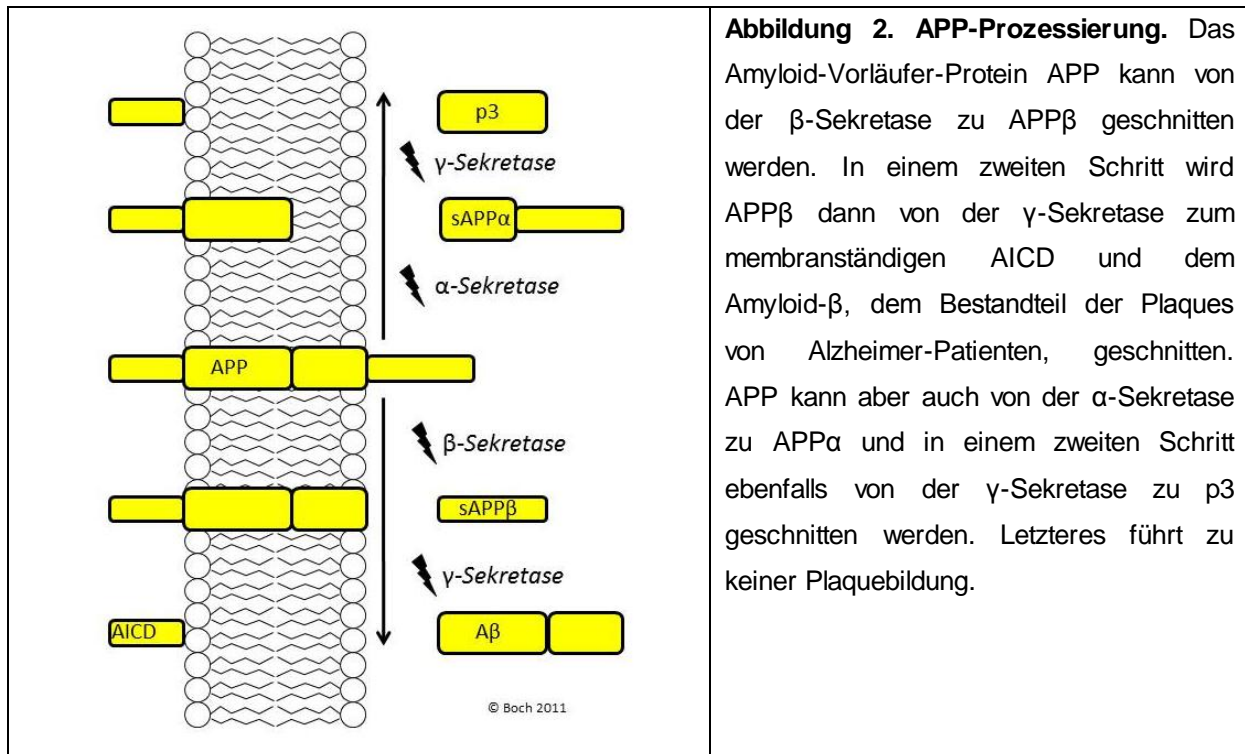
Bei beiden handelt es sich um intrazerebrale Ablagerungen, welche vor allem im Hippocampus, entorhinalen Cortex und Neocortex beobachtet werden (10). Sie führen auf noch ungeklärte Weise zu Funktionsstörungen und zum Untergang von Nervenzellen, was die vorne genannten kognitiven Störungen der Patienten nach sich zieht. Nervenzellen kommunizieren über Synapsen, einer Art Kontaktstelle zwischen benachbarten Nervenzellen. Beim Verlust ständiger Signale aus ihrer Umgebung bilden sie sich zurück, was für den Nervenzellverband einen Verlust von möglichen Informationsübertragungswegen bedeutet.

Grund für den Verlust der Umgebungssignale ist z. B. ein gestörter Stoffwechsel von Neurotransmittern wie Acetylcholin und defekte präsynaptische Vesikelproteine (11) (12) (13). Vor allem im Initialstadium der Krankheit scheinen solche Störungen eine herausragende Rolle zu spielen. So wird bei Alzheimer-Erkrankten eine verminderte Zahl an Synapsen beobachtet, was je nach Grad der Verminderung mit der Schwere der Symptome korreliert (14).

2.1.2.1. Amyloid-Plaques

Amyloid-Plaques werden in Blutgefäßen und im Extrazellularraum des Hirnparenchyms von Alzheimer-Patienten gefunden. Ihren Ursprung haben sie im membranständigen Amyloid-Vorläufer-Protein APP (*amyloid-precursor-protein*) (15). Dieses wird von Enzymen prozessiert, wobei zwei Wege eingeschlagen werden können:

- Nicht-amyloidogener Weg: APP wird von der α -Sekretase geschnitten, es entsteht APP α . Nach einem zweiten Schnitt durch die γ -Sekretase entsteht das Protein p3 und AICD (*APP intracellular domain*).
- Amyloidogener Weg: Die β -Sekretase BACE-1 (*beta-site of APP cleaving enzyme*) schneidet APP, es entsteht APP β . Das carboxy-terminale Fragment wird im Anschluss ebenfalls von der γ -Sekretase geschnitten. Die Schnittstellen variieren, sodass Amyloid- β -Proteine mit einer unterschiedlichen Länge von 39 - 42 Aminosäuren (A β ₃₉ – A β ₄₂) und AICD entstehen (16) (17). Hauptsächlich handelt es sich beim Amyloid- β um A β ₄₀ und A β ₄₂. Letzteres findet sich viel seltener als A β ₄₀, aggregiert aber leichter, ist neurotoxischer und anscheinend der Initiator der Plaquebildung (18) (19).



APP α , APP β , Amyloid- β etc. kommen natürlich im Menschen vor, ihnen werden unter anderem Rollen bei Signalen zum Zellwachstum und -überleben, Lernen sowie Synapsen- und Gedächtnisbildung zugeschrieben (20) (21).

Abgebaut wird das Amyloid- β hauptsächlich durch die Enzyme Neprilysin und Insulysin (auch IDE für *insulin degrading enzyme*) (22) (23).

Ein Ungleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von A β -Peptid kann zur Anhäufung von A β -Peptid-Monomeren führen. Diese können zu Oligomeren aggregieren und über Protofibrillen und Fibrillen letztlich Plaques bilden. Diese sind mutmaßlich für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit verantwortlich (24).

2.1.2.2. Neurofibrillen

Tau ist ein vor allem im Zentralen Nervensystem vorkommendes intrazelluläres Protein, welches Mikrotubuli stabilisiert und an deren Bildung beteiligt ist (25). Ist es wie im Falle der Alzheimer-Demenz hyperphosphoryliert, die Gründe dafür sind weitestgehend unbekannt, wird es unlöslich und bildet paarweise helikale Filamente. Diese sind Hauptbestandteil der Neurofibrillen (26).

Die Hyperphosphorylierung destabilisiert die Mikrotubuli und der intrazelluläre Transport wird gestört, wodurch die Nervenzellen geschädigt werden. Neurofibrillen scheinen bei der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit eine Rolle zu spielen, welche genau und wie diese mit dem Neuronenuntergang und dem Amyloid- β in Zusammenhang stehen, ist Gegenstand der aktuellen Forschung (27). Eventuell stellen sie auch ein krankheitsunspezifisches Phänomen neurodegenerativer Erkrankungen dar, da sie bei vielen anderen Krankheiten wie dem Morbus Pick, der amyotrophen Lateralsklerose im Parkinson-Demenz-Komplex, der progressiven supranukleären Blickparese etc. vorkommen (28).

2.2. Neuroinflammation

Die Reaktion des Organismus auf verschiedene (schädigende) Reize nennt man Entzündung / Inflammation (29). In einem solchen Fall ist z. B. das Komplement- und Fibrinolyse-System aktiviert, Akute-Phase-Proteine werden ausgeschüttet und Zytokine / Chemokine werden verstärkt von aktivierten Immunzellen abgegeben. Bei Alzheimer-Patienten kann dies im gesamten Verlauf der Erkrankung beobachtet werden (30) (31) (32) (33).

Eine in der Krankheitsentstehung wichtige Rolle spielen dabei Makrophagen. Hierbei handelt es sich um spezielle Immunzellen, welche Stoffe phagozytieren und andere Immunzellen aktivieren können. Im ZNS können dabei zwei Arten von Makrophagen gefunden werden. Die ortsständigen Makrophagen, die als Mikroglia bezeichnet werden, und eine Untergruppe von peripheren Blutmakrophagen. Beide entstammen vermutlich ursprünglich einer gemeinsamen hämatopoetischen myeloischen Vorläuferzelle. Während der Embryogenese migrieren dabei die Mikrogliazellen ins spätere ZNS.

Die peripheren Makrophagen haben die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke überwinden zu können, und dort, im Vergleich zur Mikroglia, sehr effektiv Amyloid- β zu phagozytieren (34) (35). Stimuliert werden sie unter anderem von Zytokinen oder anderen Peptiden, im Falle der Alzheimer-Demenz vom Amyloid- β -Peptid. Sie differenzieren sich dann in ihre aktive Form und können ihre noch nicht vollständig geklärte Rolle in der Pathogenese der Krankheit wahrnehmen (36). In dieser Arbeit wurden als Marker der Entzündung die Zytokine MCP-1 und TNF- α untersucht.

Anzumerken ist, dass die Entzündung in der Summe komplex ist und nicht pauschal gesagt werden kann, dass sie sich positiv oder negativ auf die Krankheit auswirkt. So könnten Mediatoren zu Beginn der Krankheit negativ, aber im späteren Verlauf begünstigend wirken (37). Ungeklärt ist auch, ob die Entzündung mit ursächlich und / oder verstärkend ist, oder die Reaktion auf andere Stimuli darstellt. So führen auf der einen Seite A β -Ablagerungen zur Aktivierung der Mikroglia, auf der anderen Seite führen Entzündungsmediatoren zu einer erhöhten Produktion von A β durch Nervenzellen (38) (39).

2.2.1. MCP-1

Das Monozyten-anlockende Protein 1 (*Monocyte chemoattractant Protein-1*; MCP-1, auch CCL2 genannt) ist eines der vier MCP-Chemokine, welche eine Untergruppe der CC-Chemokine darstellen. Ausgeschüttet durch Stimuli wie TNF- α oder Interleukin-1 bindet es an der Zielzelle an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben transmembranären Helices und löst dann eine intrazelluläre Aktivierungskaskade aus (40) (41). Chemokine haben die Aufgabe, beispielsweise Monozyten, neutrophile Granulozyten oder Lymphozyten zu bestimmten Orten im Körper zu lotsen. Die einwandernden Zellen bewegen sich dabei auf die Orte der höchsten Chemokinkonzentration zu. MCP-1 spielt bei verschiedenen Krankheiten wie HIV, Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen eine wichtige Rolle, es wird aber auch bei Alzheimer-Patienten von aktivierten Mikroglia und Astrozyten im Umfeld der Amyloid- β -Plaques ausgeschüttet. In ihren Gehirnen werden stets erhöhte MCP-1-Konzentrationen gemessen, und das in allen Phasen der Krankheit. Es löst dabei per se keine entzündliche Veränderung dieser Zellen aus, erhöht aber deren Empfindlichkeit für proinflammatorische Stimuli (42) (43) (44) (45) (46) (47). MCP-1 ist ein Schlüsselzytokin im Rahmen des Entzündungsprozesses im Zentralen Nervensystem, es führt unter anderem zu einer Erhöhung von TNF- α (48).

2.2.2. TNF- α

Das Coley-Toxin wurde 1891 von William Coley entdeckt, als er den Überstand einer Mischung aus *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* zur Tumorbildung nutzte (49).

1975 wurde entdeckt, dass Makrophagen nach Stimulation mit Endotoxinen diesen Faktor ausschütteten, der relativ gezielt Tumorgewebe zerstörte. Er bekam den Namen Tumornekrosefaktor (50). Heute zählt TNF- α zu einer Superfamilie mit vielen Mitgliedern, die sehr komplex interagieren und eine Vielzahl von physiologischen wie pathophysiologischen Funktionen im Körper wahrnehmen.

Wird der Körper z. B. mit Bakterien infiziert, so kann TNF- α zu einer Proliferation, Überleben und Differenzierung von Immunzellen auf der einen Seite und Zelluntergang der infizierten Zellen auf der anderen Seite bewirken. Das wirkt sich positiv auf den Organismus aus. Auf der anderen Seite kann er bei einer Sepsis, beim Fieber und bei Gewichtsverlust im Rahmen einer Tumorerkrankung schädlich für den Menschen sein (51). Bei Alzheimer-Patienten bewirkt die Exposition von A β erhöhte TNF- α -Werte in Blutplasma, Liquor und Hirnparenchym. Wie bei anderen ZNS-Erkrankungen, z. B. Parkinson, Multiple Sklerose und bei Schlaganfall, könnte dies zu einem Untergang von Nervenzellen führen. Andererseits wurde nachgewiesen, dass TNF- α für Neuronen des Hippocampus wachstumsfördernd sein kann, und vor freien Radikalen, Glutamat und der Amyloid- β -Toxizität schützt. Außerdem ist der Untergang von Nervenzellen größer, wenn der TNF-Rezeptor fehlt. Eine Hauptwirkung von TNF- α ist die Aktivierung des nukleären Faktors κB (NF κB). Dieser Transkriptionsfaktor bewirkt die Produktion von proinflammatorischen Faktoren wie Komplement und Cyclooxygenase (COX), aber auch von Überlebensfaktoren wie Calbindin und Bcl-2 (32).

2.3. Membrane rafts

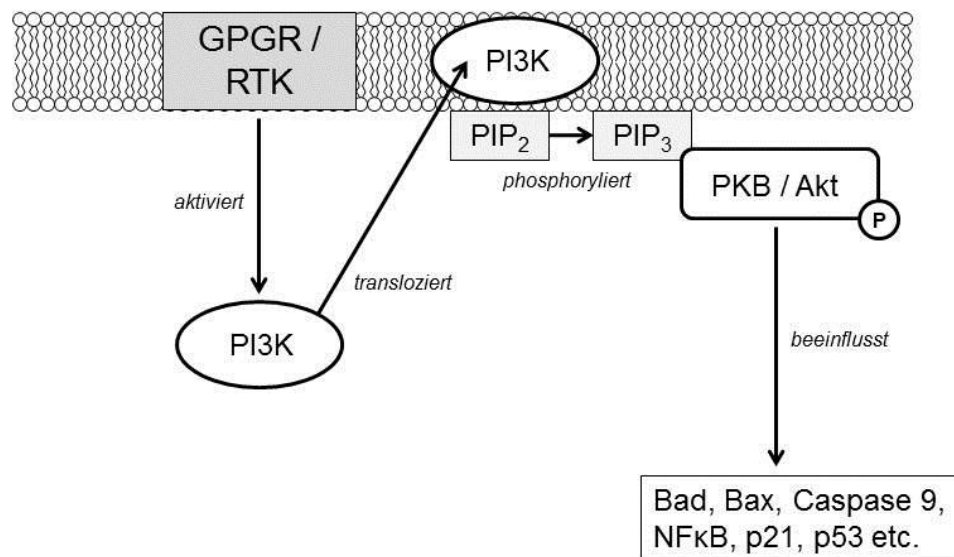
Wie genau die entzündliche Makrophagenantwort auf zellulärer Ebene zustande kommt, ist nur in Ansätzen verstanden. Seit einigen Jahren gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass die Zellmembran hierbei eine Rolle spielt. 40 Jahre nach Singers Flüssig-Mosaik-Modell der Zellmembran (52) wissen wir heute, dass die Zellmembran mehr als ein zweidimensional orientiertes Konstrukt einer Phospholipid-Doppelschicht ist, welche als Lösung für diverse Membranproteine dient. Entgegen früheren Annahmen verändert sich die Komposition an Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten ständig, diffundieren Proteine gezielt lateral durch die Membran oder wechseln die Lipidschicht.

Bestimmte Membranbereiche können sich dabei durch ihre Lipidzusammensetzung von ihrer Umgebung abgrenzen, sie bilden so genannte Mikrodomänen. Diese auch als *Rafts* (deutsch: Flöße) bezeichneten Bereiche scheinen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von sowohl patho- als auch physiologischen Prozessen inne zu haben (53). Zu nennen wären unter anderem der Einbau von GLUT4 in die Plasmamembran (54), die Aufnahme von Fettsäuren in die Zellen (55), die Entstehung von Atherosklerose (56), Apoptose und damit Karzinogenese (57) und HIV-Infektion (58).

Bei den *Membrane rafts* handelt es sich um kleine (10 – 200 nm), heterogene, hoch dynamische, cholesterin- und sphingolipidangereicherte Bereiche, welche zelluläre Prozesse auftrennen. Kleine *Rafts* können stabilisiert werden und dann durch Protein-Protein- oder Protein-Lipidinteraktionen größere Plattformen bilden (59). Das Verständnis, wie *Membrane rafts* mit Alzheimer-Demenz in Verbindung steht, ist noch gering, es gibt jedoch Hinweise, dass die Verknüpfung der *Membrane rafts* und Schlüsselproteinen der A β -Entstehung wie APP, γ -Sekretase und BACE-1 eine Rolle spielen (60) (61) (62).

2.3.1. Sphingolipidstoffwechsel

Wird das Glycerin der Phosphoglyceride (Glycerid = Acylglycerin) durch den Alkohol Sphingosin ersetzt, so entstehen Sphingolipide. Sie sind nicht nur, wie vorher beschrieben, Bausteine der Zellmembran, sondern an vielen Aktionen der Zellen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Inflammation beteiligt. Folgende Grafik zeigt einen Ausschnitt aus dem Sphingolipidstoffwechsel.



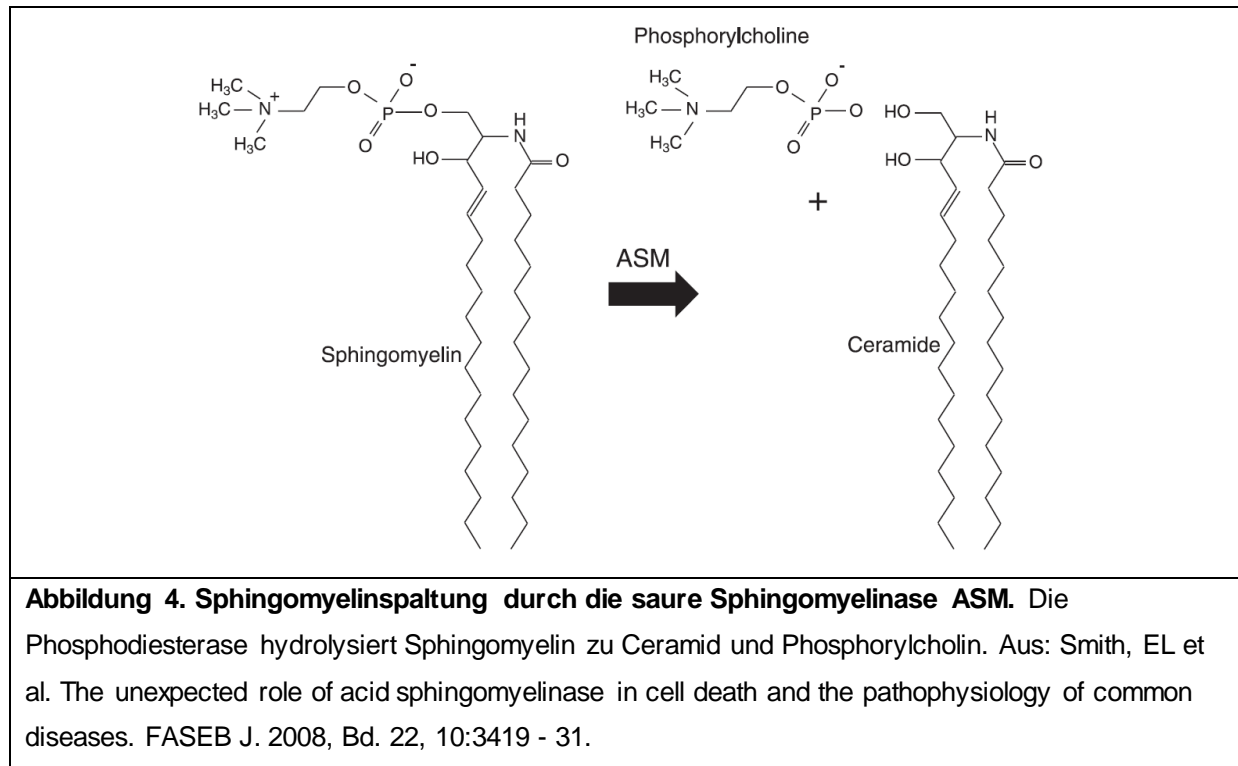
© Boch 2011

Abbildung 3. Ausschnitt aus dem Sphingolipid-Stoffwechsel. Modifiziert nach Ogretmen und Hannun (63). Zentraler Spieler ist das Ceramid. Abkürzungen: Ceramidkinase (CK), Ceramid-1-Phosphat-Phosphatase (C1PP), Sphingomyelin-Synthase (SMS), Sphingomyelinase (SMase), Ceramidsynthase (CS), Ceramidase (CDase), Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatase (S1PP), Sphingosinkinase (SK).

Die verschiedenen Zwischenstufen des Sphingolipid-Metabolismus sind dabei oft selbst bioaktiv, was das Verständnis der Stoffwechselwege erschwert. So kann z. B. Sphingosin-1-Phosphat Proliferation, Angiogenese und einen Schutz vor Apoptose darstellen, der Vorläufer Ceramid aber Zellzyklusarrest und Apoptose bewirken (63). Diese zwei gegenläufigen Mechanismen zeigen, wie genau diese Prozesse reguliert sein müssen.

2.3.1.1. Saure Sphingomyelinase (ASM)

Die saure Sphingomyelinase ist ein Enzym, welches Sphingomyelin, ein Hauptlipid der Zellmembran, zu Ceramid und Phosphorylcholin hydrolysiert.

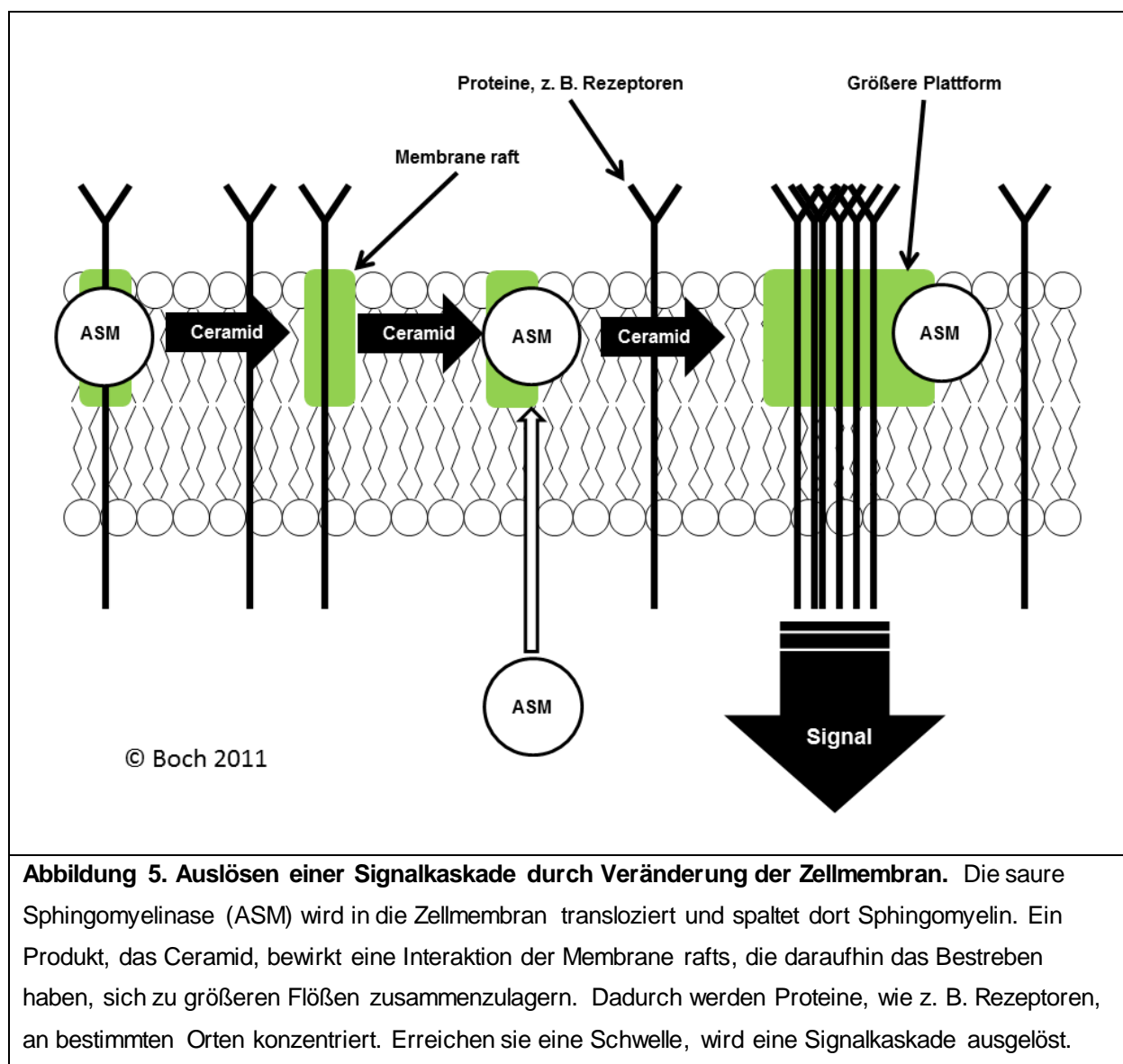


Sie gehört zu einer Gruppe von Sphingomyelin-spaltenden Enzymen, die nach ihren pH-Optima in neutrale, alkalische und saure Sphingomyelinasen eingeteilt werden. Weiter ist eine Unterteilung nach ihren Lokalisationen (Lysosomen oder Zellmembran) oder ihrer Abhängigkeiten von Mg^{2+} -Ionen möglich. Die saure Sphingomyelinase ist in Endosomen und Lysosomen lokalisiert und wird auf noch nicht gesicherte Weise durch diverse Stimuli in das äußere Blatt der Plasmamembran transloziert (64) (65) (66) (67).

Das dort produzierte Ceramid interagiert mit sich selbst und den Phospholipiden, verdrängt dabei andere Lipide und verändert so die Lipidzusammensetzung der *Membrane rafts* (68). Die *Rafts* haben das Bestreben, größere Plattformen zu bilden. Wenn sich die *Rafts* dabei aufeinander zubewegen, können sie Membranproteine „mitreißen“ und so zu einer Zusammenführung von bestimmten Proteinen, z. B. Rezeptoren, an einem Ort der Membran führen.

Ebenso können Membranproteine schon Bestandteil der *Membrane rafts* sein, und so kommt es ebenfalls zur örtlichen Anhäufung von Proteinen.

Die Konzentration bestimmter Moleküle, auch *Clustering* (deutsch: Anhäufen) genannt, kann dann einen bestimmten Schwellenwert überschreiten und so eine Signalkaskade auslösen. Dieser Ablauf wurde bei der Aktivierung des Todesrezeptors Fas (=CD95; Apo-1), CD40, der Abwehr gegen *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, der UV- oder γ -Bestrahlung und vielen anderen Prozessen beschrieben (69) (70) (71) (72) (73) (74) (75).



2.3.1.2. Proteinkinase B / Akt

Akt / PKB ist eine 57 kDa große Serin-Threonin-Kinase, ihrer Familie gehören die Mitglieder Akt-1, Akt-2 und Akt-3 an (auch PKB α , β und γ). Die drei Haupteffekte der PKB / Akt sind Zellüberleben, -proliferation und -wachstum (76).

Da Untergang und Überleben von Neuronen auch Teil der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen ist, liegt es nahe, das Enzym PKB / Akt auch aus dem Blickwinkel der Alzheimer-Krankheit zu untersuchen.

Die Proteinkinase B (PKB) / Akt ist zentraler Spieler eines der wichtigsten Signalwege des Zellüberlebens, dem Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg (PI3K). Dabei wird die PI3K über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder über Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert und in die Zellmembran transloziert. Dort phosphoryliert sie PIP₂ zu PIP₃. Dieses verankert die PKB / Akt in der Zellmembran, wo sie aktiviert wird. Sie wirkt dann vielfältig, z. B. über die Förderung des G1-S-Übergangs im Zellzyklus, Hemmung von Caspase 9 und BAD, und Transkriptionsregulation von z. B. NF κ B, p53 und Bax in Nervenzellen, usw. (77) (78) (79). Die Proteinkinase B / Akt begünstigt also ein Überleben von Neuronen.

Auf der anderen Seite ist die saure Sphingomyelinase und ihr Produkt Ceramid zu betrachten, das vor allem mit einem Niedergang von Neuronen in Verbindung gebracht wird. Ceramid hat die Fähigkeit direkt und indirekt die PKB / Akt zu hemmen (80) (81).

2.4. Toll-like-Rezeptor-Ligand Pam3CSK4

Als Kontroll-Stimulanz wurde der synthetische TLR-1/2-Ligand Pam3CSK4 gewählt. Bei TLR handelt es sich um so genannte Toll-like-Rezeptoren. Sie sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, welche schädliche Antigene, so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), erkennen, binden und dann eine Immunantwort auslösen. Für den Toll-like-Rezeptor 2 wurde aufgezeigt, dass er bei A β -Exposition in Immunzellen eine entzündliche Antwort auslöst (82) (83)

2.5. Fragestellung

1. Gelingt es experimentell in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 die Aktivität der sauren Sphingomyelinase beziehungsweise der Akt / PKB zu reduzieren, um damit den Einfluss dieser Enzyme auf eine spätere Stimulation dieser Zellen mit Alzheimer Amyloid Protein zu studieren?
2. Kann durch Verminderung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase eine Veränderung in der Ausschüttung der Zytokine TNF- α und MCP-1 gemessen werden, nachdem die Zellen mit Amyloid- β -Peptid oder dem TLR-Liganden Pam3CSK4 stimuliert wurden?
3. Kann durch Verminderung der Aktivität der Akt / Proteinkinase B eine Veränderung in der Ausschüttung der Zytokine TNF- α und MCP-1 gemessen werden, nachdem die Zellen mit Amyloid- β -Peptid oder dem TLR-Liganden Pam3CSK4 stimuliert wurden?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

4K15 Tischkühlzentrifuge	Sigma
Accujet	Brand
Axiovert 40	Carl Zeiss
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Eclipse TE2000-U	Nikon
HERAfreeze -86C Top Super Insulation Freezers	Thermo Scientific
inoLab	WTW
KERN ABS 120-4	Kern
KERN EW	Kern
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad
Monotherm	Variomag
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
NU-2700 CO ₂ Incubator	NuAire
PowerPac 200	Bio-Rad
PTC200 Thermo Cycler	MJ Research
Purelab Ultra	Elga
Rocky 3D	Fröbel Labor Technik
Rotator Drive STR4	Stuart Scientific
Sunrise microplate reader for ELISA assays	Tecan
Tecan Safire Multi-mode Fluorescence, FI, TRF, FRET and Absorbance	MTX Lab Systems
Thermo Block TDB 120	Biosan

3.1.2. Chemikalien, Enzyme, Kits

100 bp DNA Ladder	New England Biolabs
AK goat anti rabbit HRP	Promega
AK rabbit anti AKT1	Cell signaling

Akt Antibody #9272	Cell signaling
Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich
Ampicillin Natriumsalz	MP Biomedicals
Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit	Invitrogen
Anti-actin, clone C4	Millipore
Antibiotic-Antimycotic (liquid)	Invitrogen
ASM Antibody #3687	Cell signaling
A β 42	Genicbio (Hongkong)
<i>Bam</i> HI	Fermentas
<i>Bgl</i> II	Fermentas
Block-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit	Invitrogen
BSA (100x)	New England Biolabs
Chloroform (reinst)	Apotheke des Universitätsklinikum des Saarlandes
ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs
Complete protein inhibitor cocktail	Roche
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
EDTA	Serva
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
FCS	Pan Biotech
Glycin	Sigma-Aldrich
Hepes	Sigma
Human MCP-1 ELISA Set	BD Biosciences
Human TNF ELISA Set	BD Biosciences
Hygromycin B	Pan Biotech
Lipofectamine 2000	Invitrogen
MgCl	Fluka
Milchpulver	Roth
Na ₃ VO ₄	Sigma
NaCl	Apotheke des Universitätsklinikums Homburg
NaF	Merck

NEBuffer 3	New England Biolabs
OptiMEM I Reduced Serum Medium	Fisher
Pam3CSK4	Invivogen
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen
Rotiphoresegel 30	Roth
RPMI 1640 Medium (1X), liquid	Invitrogen
RQ1 DNase Buffer 10 x	Promega
RQ1 RNase-Free DNase	Promega
RQ1 Stop-Lösung	Promega
SDS-Puffer	Sigma-Aldrich
Tris-Puffer	Sigma-Aldrich
Trizol Reagent	Invitrogen
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich

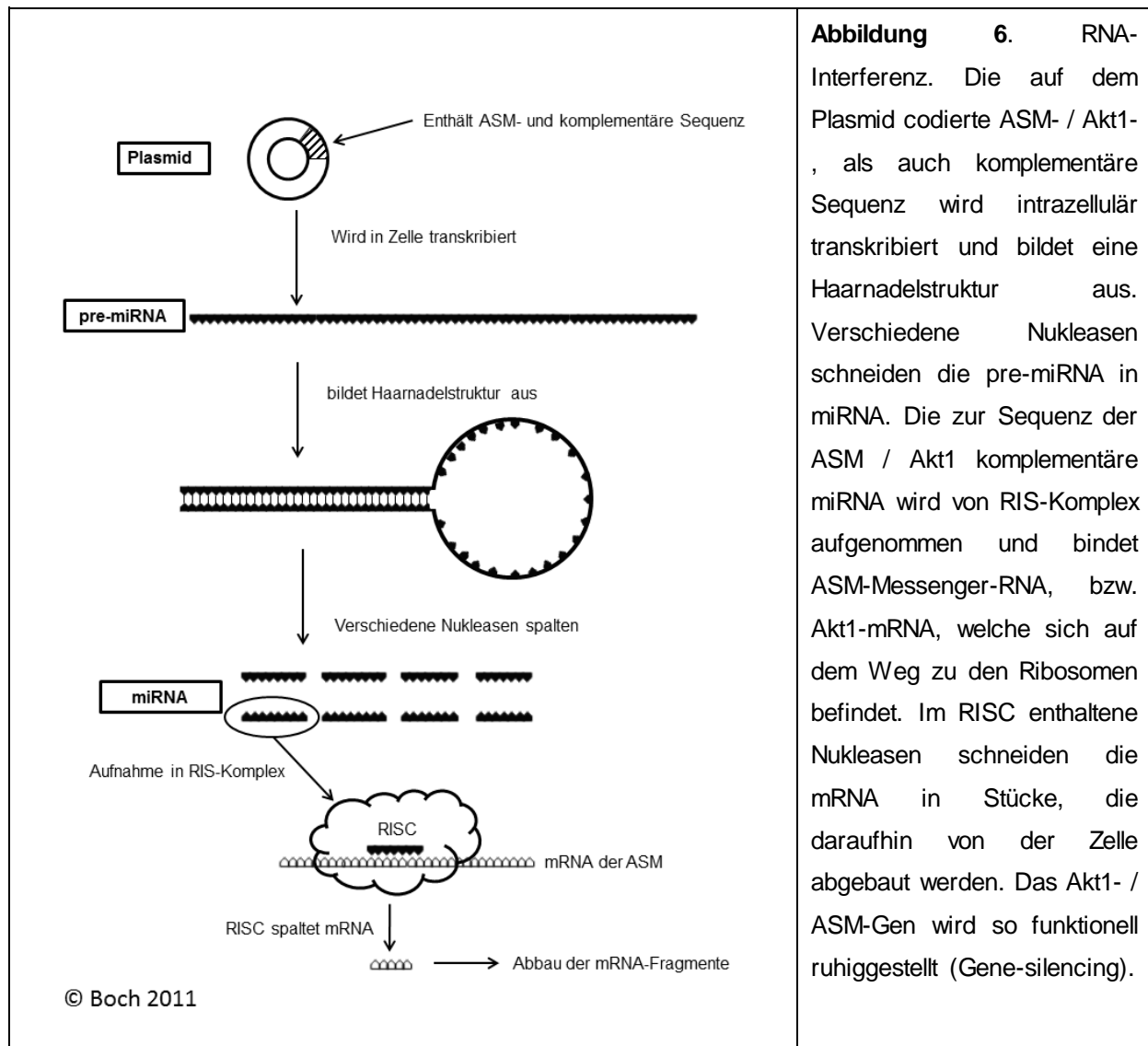
3.1.3. Gebrauchsmaterialien

48-well Multiwell Plate	BD Falcon
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
Cryo Pure	Sarstedt
Elisa plate 96 well flat-bottom, Microtest, clear	BD Falcon
Hyperfilm ECI	GE Healthcare
Hyperfilm ECL	GE Healthcare Life Sciences
Neubauer-Zählkammer	Brand
Parafilm "M"	Pechiney
THP-1 Zellen	DSMZ
Whatman® Tranfermembran; Protran BA 83	Hartenstein
Zellkultur-Schalen 100 x 20 mm	Sarstedt
Zentrifugenröhre 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhre 50 ml	Sarstedt

3.2. Methoden

3.2.1. RNA-Interferenz (RNAi)

Mit der Methode der RNA-Interferenz (RNAi) wurde auf posttranskriptioneller Ebene die Produktion der sauren Sphingomyelinase vermindert. Dazu wurde in die Zielzelle ein Plasmid transfiziert, welches unter anderem ein ca. 68 Basenpaare langes Oligonukleotid enthielt, was neben einer Haarnadelstruktur-Sequenz sowohl die Sequenz der sauren Sphingomyelinase / Akt1 als auch die dazu komplementäre Basenreihenfolge enthält. Wurde es in der Zelle transkribiert, lagerten sich die komplementären Basenpaare aneinander und bildeten so eine Doppelstrang-RNA mit Haarnadelstruktur aus. Dieses als pre-miRNA bezeichnete Produkt wurde von Ribonukleinasen in ca. 22 Basenpaare lange Einzelstrang-miRNAs geschnitten und im RISC-Komplex (RISC – RNA inducing silencing complex) aufgenommen. Dieser RISC band die Saure-Sphingomelinase-mRNA / Akt-mRNA und degenerierte sie. Die Proteinexpression war somit vermindert.



3.2.2. Plasmidvektor

Dr. Wenlin Hao stellte Vektoren (*pcDNA™6.2-GW/EmGFP/miR Validated miRNA Vector*) zur Verfügung, in die Doppelstrangoligomere kloniert waren, welche die Basensequenzen der pre-miRNA der Akt / Proteinkinase B und der sauren Sphingomyelinase enthielten. Ein dritter Vektor enthielt eine Basensequenz, die weder ASM noch Akt1 suppressierte, er diente als Kontroll-Vektor.

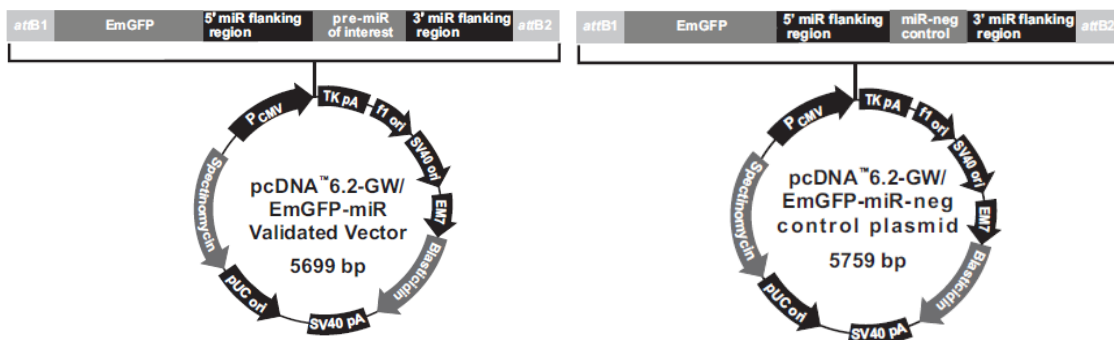


Abbildung 7: Invitrogen, BLOCK-iT™ Pol II miR Validated miRNA Vector DuoPaks, 2005

3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Agarosegelen können Nukleinsäuren entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Je größer das Molekulargewicht der Nukleinsäuren ist, desto langsamer können sie entlang eines an das Agarosegel angelegten elektrischen Feldes wandern. Zur Herstellung wurden 500 mg Agarosepulver mit 25 ml TBE und 25 ml dH₂O 3 Minuten bei 400 Watt erhitzt und mit 50 µl Ethidiumbromid (500 µg / ml) vermischt. Die Mischung wurde in eine Gelkammer gegossen, nach 20 Minuten war das Gel erhärtet und konnte genutzt werden.

3.2.4. Insertionskontrolle der Plasmidvektoren per Elektrophorese

Master-Mix: 1 µl NEB-Buffer 3 + 1 µl BSA (100x) + 1 µl *Bam*HI (10 U / µl) + 1 µl *Bgl*II (10 U / µl) + x µl Plasmid + y µl ddH₂O

Zur Kontrolle, ob die pre-miRNA erfolgreich in die Vektoren kloniert wurde, wurden jeweils 6 µl Plasmid (Kontroll-Plasmid: 947 µg / ml, ASM-Plasmid: 660 µg / ml und Akt1-Plasmid: 1586 µg / ml) mit 4 µl Master-Mix vermischt und diese bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Bei *Bam*HI und *Bgl*II handelte es sich um Restriktionsendonukleasen, welche die Oligonukleotide aus dem Vektor herausschnitten. Im Anschluss wurde die Probe mit 2 µl Loading Dye vermischt und 10 µl der Mischung in eine Tasche eines 1%igen Agarose-Gels pipettiert.

Das Gel wurde in eine mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und für 30 Minuten eine Spannung von 120 Volt angelegt. Mit UV-Licht angeregt wurden die Banden sichtbar.

3.2.5. Transfektion in THP-1-Zellen

In eine 24-well-Mikrotiterplatte wurden pro Loch 500.000 THP-1-Wildtyp-Zellen in 500 µl sterilem OptiMEM + 10 % FCS gegeben. Im Anschluss wurden jeweils 1 µg Plasmid-DNA (ASM-k. d., Akt1-k. d. und Kontroll-k. d. [k. d. = knock down]) in 50 µl OptiMEM vermischt. 170 µl OptiMEM wurde mit 10 µl Lipofectamine 2000 für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit der gelösten Plasmid-DNA auf ein Zielvolumen von 100 µl vermischt. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Komplexe zu den THP-1-Wildtyp-Zellen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in frischem RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Anti-Anti für 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Zur Etablierung einer stabilen Zelllinie wurde das Zellmedium für 4 Wochen alle 3 Tage gewechselt und jeweils 500 µg / ml Hygromycin B zur Selektion supplementiert.

3.2.6. Zellkulturarbeit

Zellkulturmedium: RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Antibiotic-Antimycotic

Gefriermedium: RPMI 1640 + 10 % FCS + 10 % DMSO

Die THP-1-Zellen wurden in Zellkulturmedium + 250 µg / ml Hygromycin B bei 37°C und 5 % CO₂ in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Alle 2 – 3 Tage wurde der Flascheninhalt in Zentrifugenröhren abzentrifugiert, das alte Medium abgesaugt und dann die Zellen mit frischem Medium resuspendiert. Je nach Bedarf wurden die Zellen gesplittet und weiterkultiviert.

Falls erforderlich, wurde ein Teil der Zellen nach dem Abzentrifugieren in Gefriermedium resuspendiert, in 2-ml-CryoPure-Gefäßen langsam auf -80 °C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff bei -196 °C kryokonserviert.

3.2.7. Fluoreszenzmikroskopie

Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE2000-U von Nikon) wurden Wildtype- und die transfizierten THP-1-Zellen in Zellkulturschalen unter normalem Licht abfotografiert. Im Anschluss wurde ein Blaufilter verwendet, so dass nur Licht von 509 nm Wellenlänge detektiert werden konnte, welches vom Emerald Green Fluorescent Protein emittiert wurde. Transfizierte Zellen erschienen grünfarben.

3.2.8. Zelllysate

Lysepuffer: 20 mM Hepes (pH 7,4) + 150 mM NaCl + 1,5 mM MgCl₂ + 2 mM EDTA + 2 mM DTT + 1 % Triton X-100 + 1 mM PMSF + 1 mM NaF + 1 mM Na₃VO₄ + Complete protein inhibitor cocktail (Roche)

PBS: 1,37 M NaCl + 27 mM KCl + 0,1 M Na₂HPO₄ + 0,12 M NaH₂PO₄ + dH₂O

5 Millionen Zellen wurden für 5 Minuten mit 500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen. Nach Resuspension mit 1 ml kaltem PBS wurde erneut 5 Minuten mit 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 100 µl Lysepuffer (pH 7,4) ersetzt und 10 Minuten in Eis gelegt. Im Anschluss wurde 10 Minuten mit 16.100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C eingefroren oder direkt für Versuche genutzt.

3.2.9. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Die quantitative RT-PCR (RT = *real-time*; deutsch: Echtzeit-PCR) dient der Erzeugung fluoreszierender PCR-Produkte, welche gemessen werden können. Eine steigende Produktmenge bedeutet steigende Fluoreszenz und umgekehrt. Somit kann direkt auf die vorherrschende Menge RNA rückgeschlossen werden.

Zur RNA-Isolation wurden 5 Millionen Zellen für 3 Minuten bei 500 g zentrifugiert, der Überstand durch 1 ml Trizol ersetzt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten gewartet. Dann wurde bei 12.000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Gefäß 15 Sekunden per Hand geschüttelt, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, 15 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Gefäß pipettiert. Die RNA wurde unter Zugabe 500 µl Isopropanol 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und 15 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 75-prozentiges Ethanol ersetzt und gerüttelt. Anschließend wurde das Pellet bei 7.500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde bestmöglich entfernt und das offene Gefäß für 5 Minuten luftgetrocknet. Das RNA-Pellet wurde anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst und die RNA-Menge bestimmt.

Im Anschluss wurden mögliche Überreste von DNA entfernt. Dazu wurden 3 µg der isolierten RNA mit RNase-freiem Wasser auf 8 µl Gesamtvolumen in ein PCR-Gefäß gegeben. Jeweils 1 µl DNase (1 U / µl) und DNase-Puffer wurden hinzugegeben und die Lösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde 1 µl Stop-Lösung hinzugegeben und die Probe für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt. Im Anschluss wurde kurz abzentrifugiert und die Probe auf Eis gestellt.

Zum Erstellen von cDNA wurde den Proben 1 µl Random Primer (250 ng / µl) und 1 µl dNTP-Mix (10 nM) hinzugegeben und nach 5 Minuten bei 65 °C für 2 Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden 2 µl DTT (0,1 M), 4 µl First strand buffer (5 x) und 1 µl Superscript III Reverse Transcriptase hinzugefügt. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde für 1 Stunde bei 50 °C inkubiert. Die Transkriptase wurde bei 70 °C für 15 Minuten inaktiviert.

Die Echtzeit-PCR wurde mit folgendem Mastermix-Ansatz durchgeführt:

- 0,5 µl Primer forward (10 pM / µl)
- 0,5 µl Primer reverse (10 pM/ µl)
- 8 µl RNase-freies Wasser
- 10 µl Kapa Sybr Fast Mastermix (Kapa Biosystems)

18,5 µl der Mastermixes wurden mit 1 µl cDNA in einer 96-*well*-Platte gemischt und dann nach einer 10-Minütigen 95°C-Phase für 40 Zyklen jeweils 15 Sekunden 95°C → 60 Sekunden 60°C → langsames Erhitzen auf 95°C usw. erhitzt.

Primersequenzen (alle 5' → 3')

ASM Primer forward	ASM Primer reverse
<i>GTCTCCGCCTCATCTCTCTC</i>	<i>GCACTTTGTCTCCTCGATCC</i>
Akt1 Primer forward	Akt1 Primer reverse
<i>CATCCTGGTCCTGTCTTCCT</i>	<i>CTCTCCCTGTCCATGGTGTT</i>
GAPDH Primer forward	GAPDH Primer reverse
<i>GAAGGACTCATGACCACAGT</i>	<i>GTCATCATATTTGGCAGGTT</i>
β-Actin Primer forward	β-Actin Primer reverse
<i>CACTCTTCCAGCCTTCCTTC</i>	<i>TGATCTCCTTCTGCATCCTG</i>

3.2.10. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgel: bidestH₂O + 5 % 30%-Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung + 1,5 M Tris (pH 6,8) + 10 % SDS + 10 % APS + TEMED

Laufgel: bidestH₂O + 10 % 30%-Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung + 1,5 M Tris (pH 8,8) + 10 % SDS + 10 % APS + TEMED

Elektrophoresepuffer: dH₂O + 0,25 M Tris + 1,92 M Glycin + 0,1 % SDS

Zusammensetzung der Gel-Lösung für 1 Minigel (Gesamtvolumen etwa 9 ml):		
	Sammelgel (5 %)	Laufgel (10 %)
Bisacrylamid	420 µl	2,15 ml
Tris-HCl	940 µl (pH 6,8)	2,5 ml (pH 8,8)
bidestH ₂ O	1,1 ml	1,65 ml
10 % SDS	25 µl	65 µl
TEMED	3 µl	8 µl
10 x APS	25 µl	65 µl

Mit der SDS-PAGE können Proteingemische aufgetrennt und mit Hilfe von Protein-Leitern die Molekülmassen abgeschätzt werden. Die unterschiedliche Ladungsdichte der Proteine wird dabei durch das stark negativ geladene Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) angeglichen. Im Anschluss werden die Proteine mittels eines elektrischen Feldes durch ein Polyacrylamid-Gel zur Anode hin bewegt. Kleine Proteine gelangen schneller durch die Poren des Gels und so werden sie ihrer Masse nach aufgetrennt.

Die SDS-PAGE wurde mit dem „Mini-PROTEAN 3 Cell®“ durchgeführt. Die Glasplatten wurden mit Wasser und 70%igen Ethanol von vorherigen Elektrophoreseüberresten gesäubert und das System nach Herstellerangaben zusammengebaut. Nach Einfüllen des frisch angesetzten Trenngels wurde Isopropanol nachgefüllt um eine gerade Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erzeugen. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und durch Sammelgel ersetzt.

Im Anschluss an dessen Polymerisation wurde die Gelkassette in die Trennkammer eingebaut, diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt und dann der beim Sammelgelgießen eingesetzte Kamm für die Probestaschen entfernt. Die Taschen wurden mit Elektrophoresepuffer gespült.

Zelllysate wurden mit Proteinprobenpuffer gemischt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. DNA-Leiter und die Probengemische wurden in die Probestaschen gefüllt, und bei 50 V das Erreichen des Trenngels abgewartet.

Dann wurde die Spannung auf 100 V erhöht und gewartet, bis die Lauffront das Ende der Gelkassette erreicht hatte.

3.2.11. Western Blot

TBS: 0,5 M Tris + 0,9 % NaCl + dH₂O (auf ~ pH 7,4 titriert)

Blockier-Puffer: TBS + 0,1 % Tween-20 + 10 % w/v Milchpulver

Erstantikörper: TBS + 0,01 % Tween + 5 % BSA; 1:1000 Antikörper

Zweitantikörper: TBS + 0,01 % Tween + 5 % w / v Milch; 1:2000 Antikörper

Transferpuffer: SDS-Laufpuffer (dH₂O + 0,25 M Tris + 1,92 M Glycin + 0,1 % SDS) + 20 % Methanol

Waschpuffer: TBS + 0.1% Tween-20

Nach einer Gelelektrophorese besteht die Möglichkeit, die aufgetrennten Proteingemische auf eine Membran zu übertragen (blotting) und diese mit spezifischen Antikörpern zu behandeln. Die zu den Antikörpern passenden Proteine können so sichtbar gemacht werden und mit Hilfe des Protein-Leiters kann ihre Molekülmasse abgeschätzt werden. Bei bekannter Masse des Proteins kann so gezielt nach einzelnen Proteinen in einer Probe gesucht werden.

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel der Kassette entnommen und mit einer Nitrocellulose-Transfermembran (Porengröße 0,2 µm) nach Herstellerangaben in das „Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell®“-System eingebaut. Nach Einfüllen von Transferpuffer wurde für eine Stunde bei 250 mA übertragen.

Im Anschluss wurden unspezifische Proteinbindungsstellen bei Raumtemperatur für eine Stunde blockiert, mit Waschpuffer drei mal 10 Minuten gewaschen und im Anschluss die Membran bei 4 °C über Nacht mit Erstantikörper (Akt- und ASM-Antikörper, Cell signaling) behandelt. Am Folgetag wurde wieder drei mal 10 Minuten gewaschen und bei Raumtemperatur für eine Stunde in Meerrettichperoxidase-markiertem Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem 3 x 10-minütigem Waschschrift wurde „Western lightning –ECL®“ auf die Membran gegeben. In der Dunkelkammer wurde auf die Membran eine Filmfolie gelegt und diese im Anschluss entwickelt.

Als Kontrollprotein (Housekeeping-Gene) diente Actin. Hierfür wurde die Membran nach der Filmauflage für 15 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurde das Protokoll ab dem Erstantikörper (diesmal Antikörper gegen Actin) erneut durchgeführt.

Um etwaige Unterschiede der Banden zu quantifizieren wurden mit dem Computerprogramm ImageJ® die Grauwerte der zuvor eingescannten Filmefolien ermittelt.

Da sowohl beim ASM- als auch beim Akt-Antikörper zwei Banden sichtbar wurden, wurden die Akt- / ASM-Farbwerte einer Spur (Lane) addiert und in Relation zur Actin-Bande der gleichen Spur gesetzt. Auf die Kontroll-k.d.-Farbwerte normiert war so eine ungefähre Aussage über die Farbreduktion möglich. Es wurde davon ausgegangen, dass die prozentuale Farbreduktion ungefähr der prozentual verminderten Proteinexpression entspricht.

3.2.12. Sphingomyelinase-Aktivitätstest

Mit dem Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit von Invitrogen besteht die Möglichkeit die Aktivität der ASM zu messen. Entsprechend der Aktivität der ASM wird Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholine abgebaut. Wird Phosphorylcholine hydrolysiert und von der Cholinoxidase verarbeitet entsteht unter anderem H_2O_2 . Das Amplex Red Reagent (10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin) reagiert mit dem H_2O_2 in einer 1:1-Stöchiometrie und es entsteht Resorufin, welches stark fluoresziert. So kann man indirekt auf die Aktivität der sauren Sphingomyelinase rückschließen.

Der Versuch wurde jeweils mit dem Zelllysate von 5 Millionen THP-1-Zellen (ASM-k.d., Akt1-k.d. und Kontroll-k.d.) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Mit dem Tecan Safire (® MTX Lab Systems) wurde mit einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

3.2.13. ELISA

Coating buffer: 0,1 M Natriumkarbonat (pH 9,5)

Assay-Dilutend: PBS + 10 % FCS

Waschpuffer: PBS + 0,05 % Tween-20

Arbeits-Detektor: PBS + Detektions-Antikörper + Sav-Meerrettichperoxidase (1 : 250)

Substrat-Lösung: Tetramethylbenzidine (TMB) + Hydrogen Peroxide

Stop Lösung: 1 M H₂SO₄

Mit dem enzymgekoppelten Immunabsorptionstest (ELISA, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) besteht die Möglichkeit, durch eine Farbreaktion Antigene, in diesem Fall die Zytokine TNF- α und MCP-1, nachzuweisen. Dazu werden antigenspezifische Antikörper auf ein Trägermaterial gebracht, das Antigen bindet. Im Anschluss werden erneut spezifische Antikörper hinzugegeben, an welche ein Enzym gekoppelt ist. Nach Oxidation des Substrates verändert sich die Farbe der Lösung. Das kann man mit einem Absorptionslesegerät messen. Über Standardreihen mit bekannten Antigenkonzentrationen kann die Konzentration errechnet werden.

Zu Beginn wurden in sterile 48-*well*-Mikrotiterplatten 200.000 THP-1-Zellen mit 500 μ l Zellkulturmedium und 10 μ M PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) pro Vertiefung pipettiert. Die Platten wurden für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurde das alte Medium gegen PMA-freies, frisches Zellmedium ausgetauscht und bei gleichen Bedingungen weitere 24 Stunden gewartet. Im Anschluss wurden pro Vertiefung 150 μ l Zellkulturmedium pur mit 5 μ M A β ₄₂, 10 μ M A β ₄₂ und 1 μ g / ml Pam3CSK4, einem TLR-2-Ligand, gegeben und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ gewartet. Zudem wurden in 96-*well*-Mikrotiterplatten 100 μ l Coating buffer mit TNF- und MCP-1-Fänger-Antikörper pipettiert, versiegelt und ebenfalls für 24 Stunden bei 4 °C gelagert.

Die 96-well-Mikrotiterplatten wurden 5 mal mit Waschpuffer gewaschen, 200 µl Assay dilutend pro Loch eingefüllt und versiegelt für 1 Stunde gewartet. Die Platten wurden erneut 5 mal mit Waschpuffer gewaschen und je 50 µl Überstand von den 48-well-Mikrotiterplatten auf die 96-well-Platten pipettiert. In die Löcher wurde 50 µl Assay dilutend nachgefüllt. Eine Standardreihe von 0 bis 500 pg / ml TNF-α bzw. MCP-1 wurde ebenfalls auf die Platte pipettiert. Dann wurde versiegelt und beim MCP-1-Versuch für 2 Stunden gewartet. Für TNF-α betrug die Inkubationszeit 24 Stunden.

Nach 7-maligem Waschen mit Waschpuffer wurde in jedes Loch 100 µl Arbeitsdetektor gefüllt und versiegelt erneut für 1 Stunde gewartet. Im Anschluss wurde 10 mal gewaschen, 100 µl Substratlösung pro Loch pipettiert und 30 Minuten im Dunkeln gelagert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 50 µl Stop-Lösung gegeben und dann innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 570 nm mit dem ELISA-Reader gemessen.

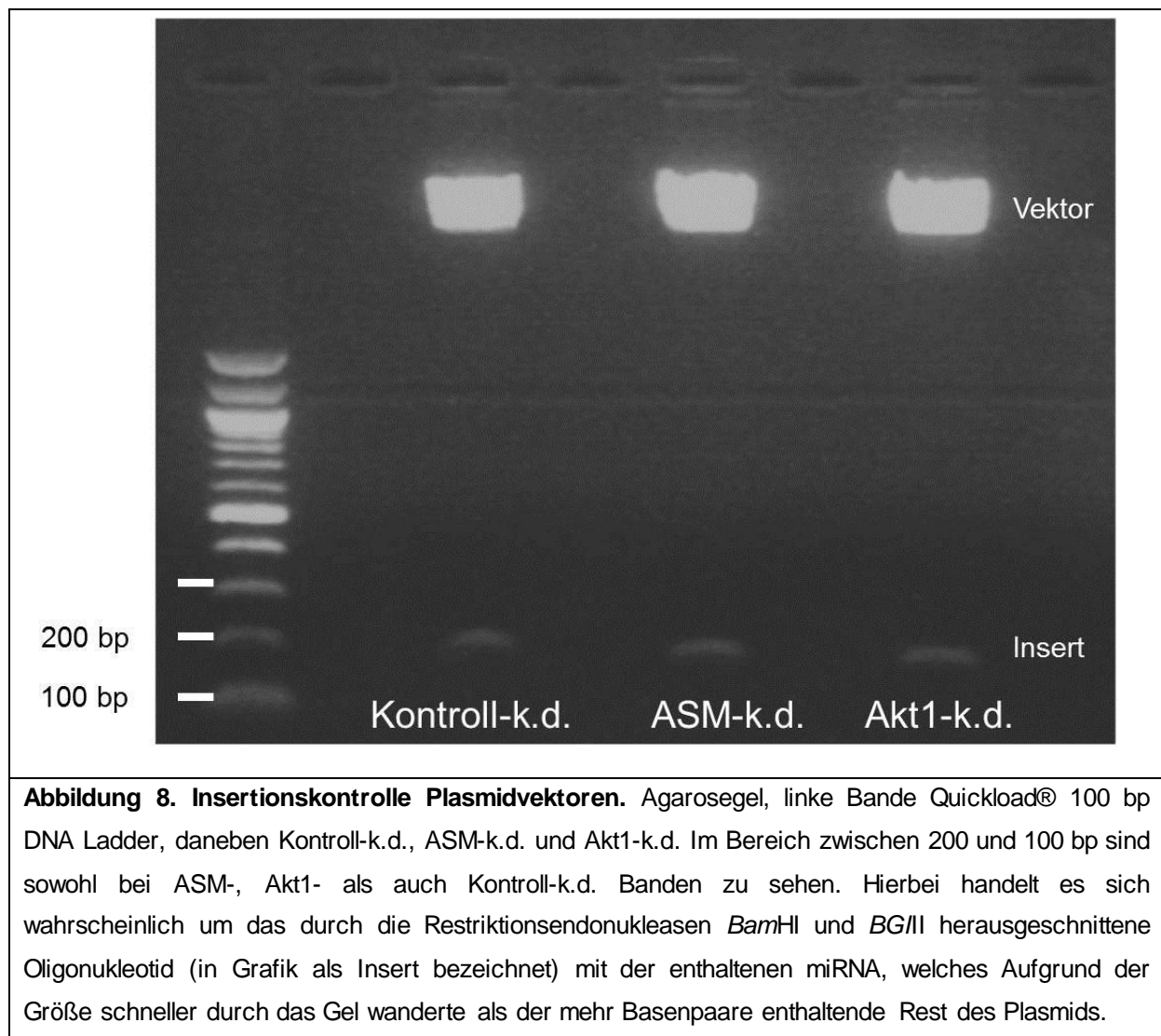
3.2.14. Statistik

Die Zahl der Sphingomyelinase-Aktivitätstest belief sich auf sechs. Es wurden neun RTqPCR-Tests zur Bestimmung der RNA-Menge durchgeführt. Die Zahl der ELISA-Versuche belief sich auf zwölf Proben für die Messung der TNF-α-Konzentrationen und 15 Proben für die Ermittlung der MCP-1-Werte. In den Grafiken beziehungsweise Texten sind, wenn nicht anders beschrieben, der Mittelwert und die Standardfehler angegeben. Die Signifikanz wurde jeweils mit dem zweiseitigen Student-t-Test berechnet. P-Werte kleiner fünf Prozent wurden als statistisch signifikant erachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Insertionskontrolle der Plasmidvektoren

Die mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Plasmidvektoren wurden durch ein 2%-Agarosegel laufen gelassen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 8. Auf Höhe der 100 – 200 Basenpaare-Bande waren bei allen drei k.d.-Zellen Banden erkennbar. Diese weisen auf das herausgetrennte Oligopeptid hin.



4.2. Fluoreszenzmikroskopie

Die Plasmidvektoren enthielten die DNA-Sequenz des Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP). Im Fluoreszenzmikroskop mit Licht einer Wellenlänge von 478 nm angeregt, emittiert dieses GFP grünfarbenes Licht.



Abbildung 9. Fluoreszenzmikroskopie Wildtype-Zellen. Fotos einer THP-1-Zellkultur ohne Anregung mit einem speziellen Filter (linkes Bild) und bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 478 nm (rechtes Bild).

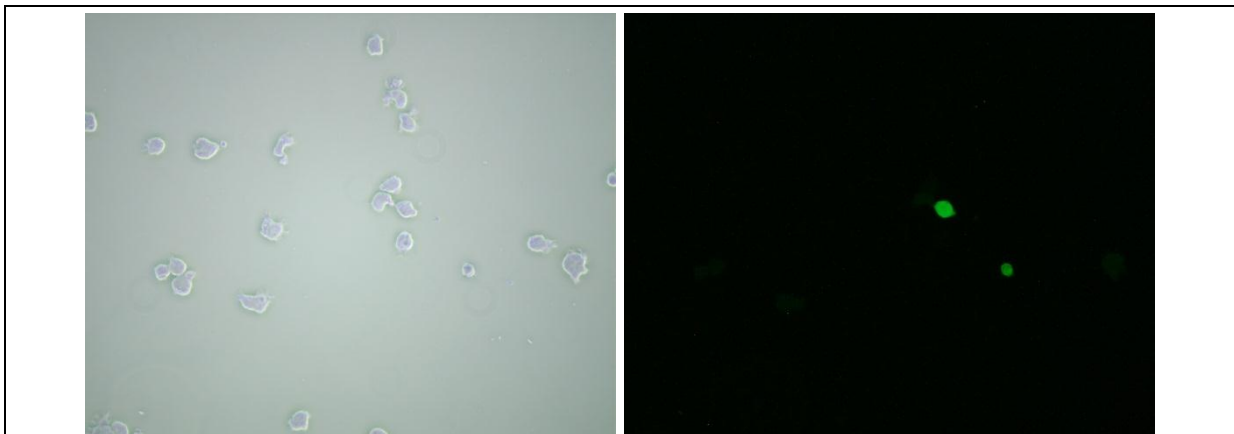
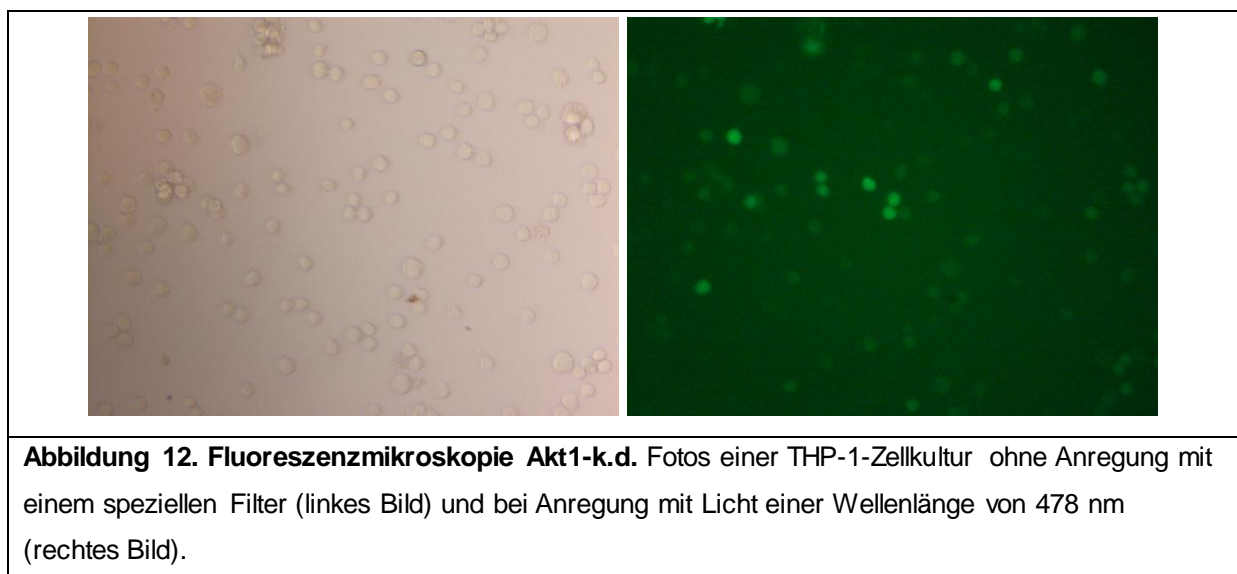
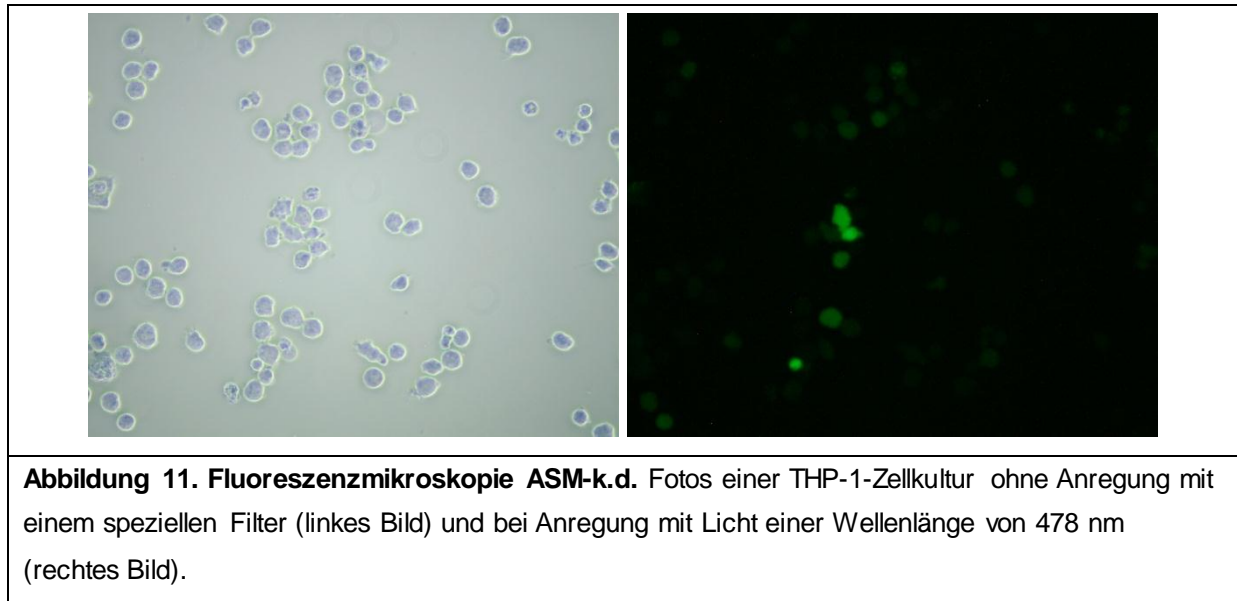


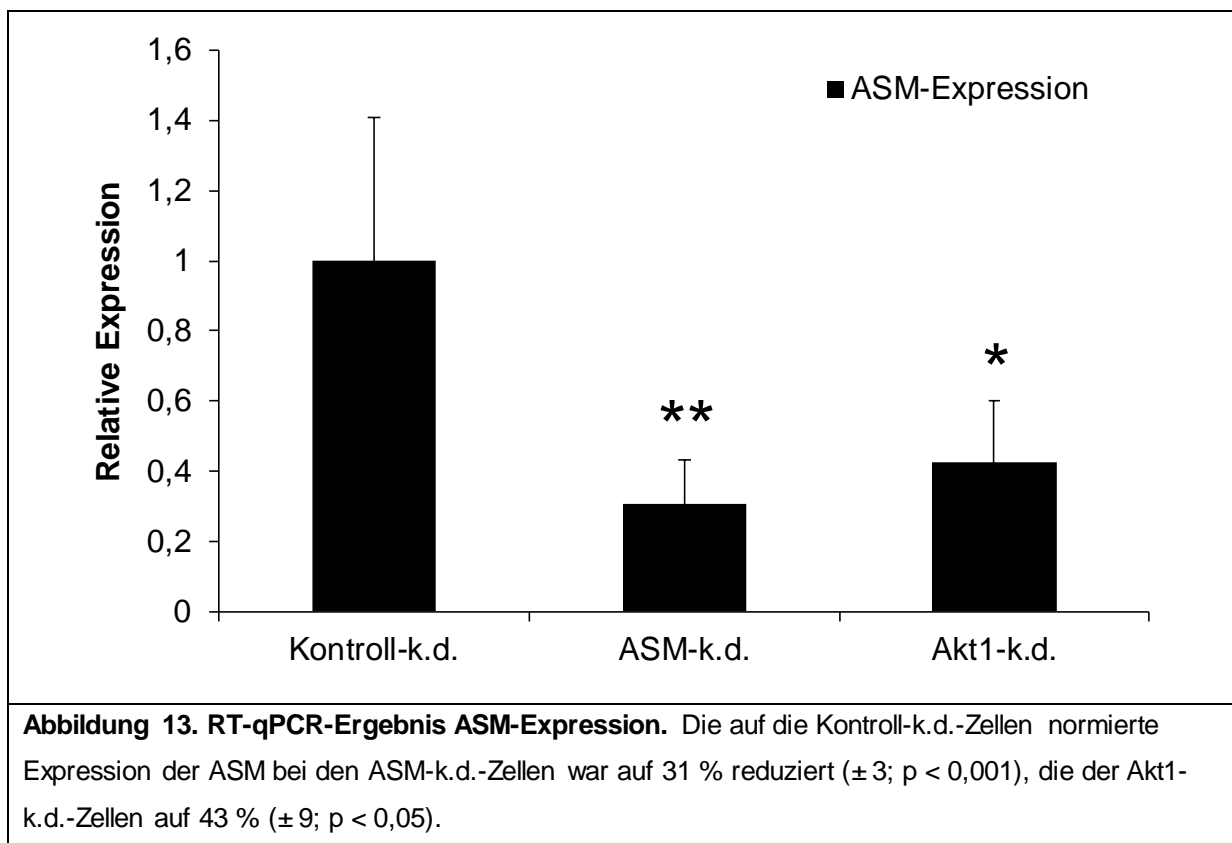
Abbildung 10. Fluoreszenzmikroskopie Kontroll-k.d. Fotos einer THP-1-Zellkultur ohne Anregung mit einem speziellen Filter (linkes Bild) und bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 478 nm (rechtes Bild).



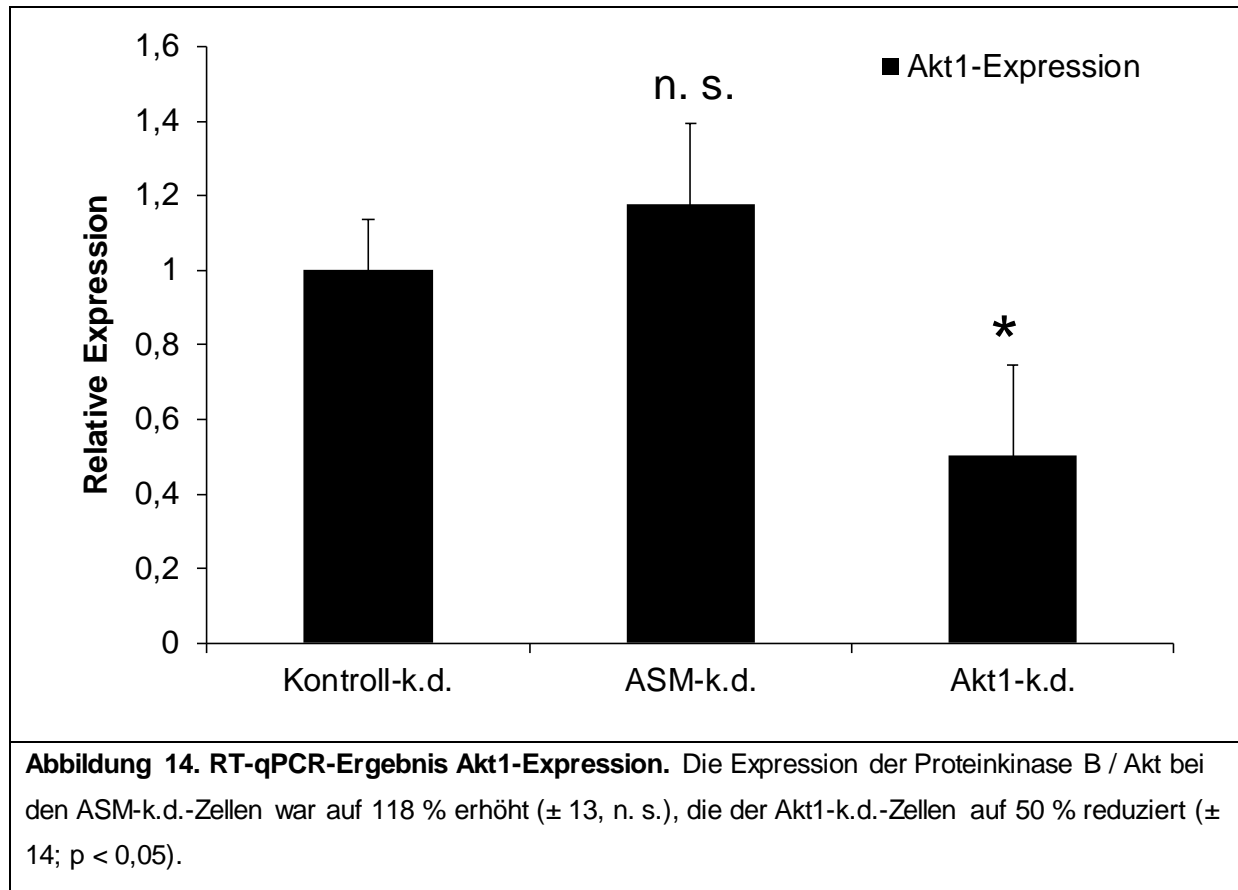
Im Gegensatz zu den THP-1-Wildtype-Zellen waren bei Kontroll-k.d., ASM-k.d. und Akt1-k.d.-Kulturen Zellen sichtbar, welche unter Anregung grünfarbenedes Licht emittierten. Da nur Zellen das EmGFP produzierten, welche die dazugehörige DNA-Sequenz mit dem Plasmidvektor aufgenommen hatten, konnte man davon ausgehen, dass die Zellen erfolgreich transfiziert wurden. Die unterschiedliche Sichtbarkeit und Anzahl von leuchtenden Zellen auf den Fotos war neben einer unterschiedlichen Zellzahl auch auf verschiedene Kontraste und Helligkeiten zurückzuführen.

4.3. RT-qPCR

Die quantitative Echtzeit-PCR zeigte eine durchschnittliche mRNA-Menge der sauren Sphingomyelinase bei den ASM-k.d.-Zellen von $31 \% \pm 3$, was einer hochsignifikanten Reduktion der ASM-mRNA im Vergleich zu den Kontroll-k.d.-Zellen entsprach ($p < 0,01$). Bemerkenswert war auch die signifikante Reduktion der ASM-mRNA bei den Akt1-k.d.-Zellen auf $43,0 \% \pm 9$ ($p < 0,05$).

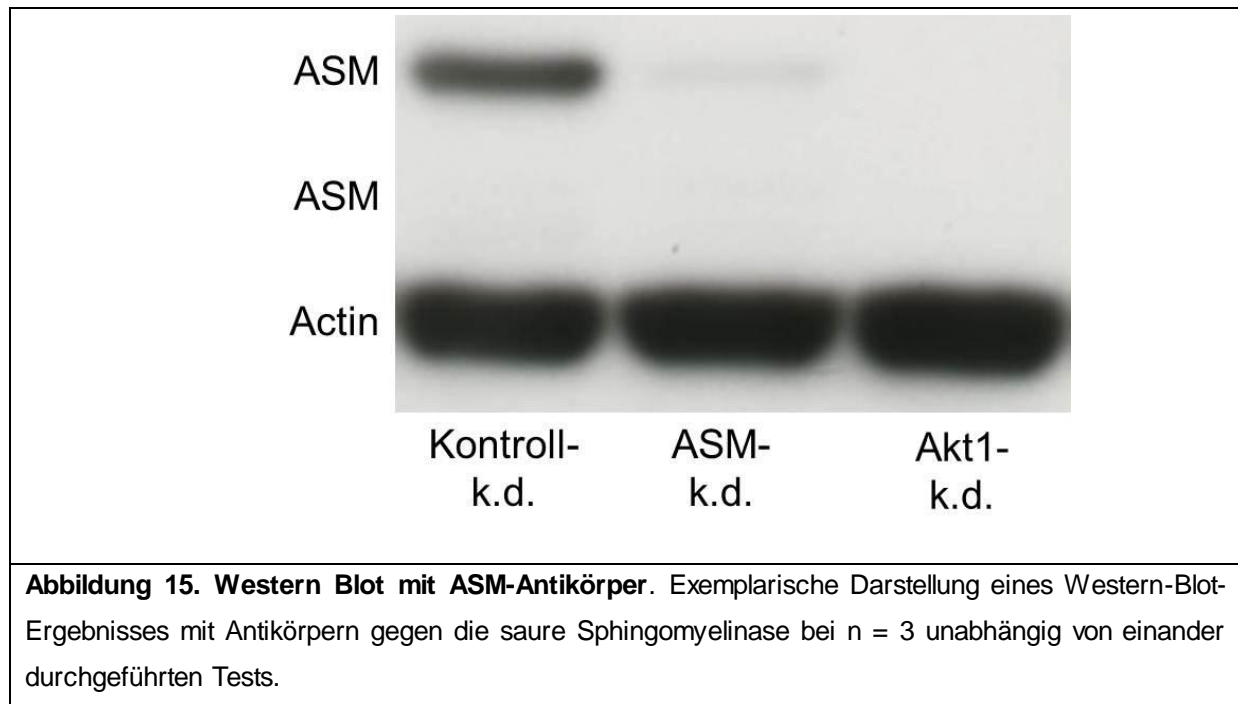


Das RT-qPCR-Ergebnis bei der mRNA der Proteinkinase B / Akt zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion bei den Akt1-k.d.-Zellen. Die Expression war auf $50 \% \pm 14$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontroll-k.d.-Gruppe reduziert. Die Akt1-Expression der ASM-k.d.-Zellen war dagegen um ca. $18 \% \pm 13$ über der Expression der Kontroll-k.d.-Zellen. Dieses Ergebnis war nicht signifikant.



4.4. Western Blot

Der Western Blot mit Antikörpern gegen die saure Sphingomyelinase zeigte Banden zirka auf Höhe der 70 kDa und knapp unterhalb von 60 kDa. Dies stimmte ungefähr mit den Herstellerangaben des Antikörpers überein, welche die ASM mit 70 und 57 kDa angaben.



Die Farbsättigung reduzierte sich im Vergleich zu den Kontroll-k.d.-Zellen bei den ASM k.d. Zellen auf $41 \% \pm 4$ ($p < 0,01$) und bei den Akt1-k.d.-Zellen auf $15 \% \pm 1$ ($p < 0,001$).

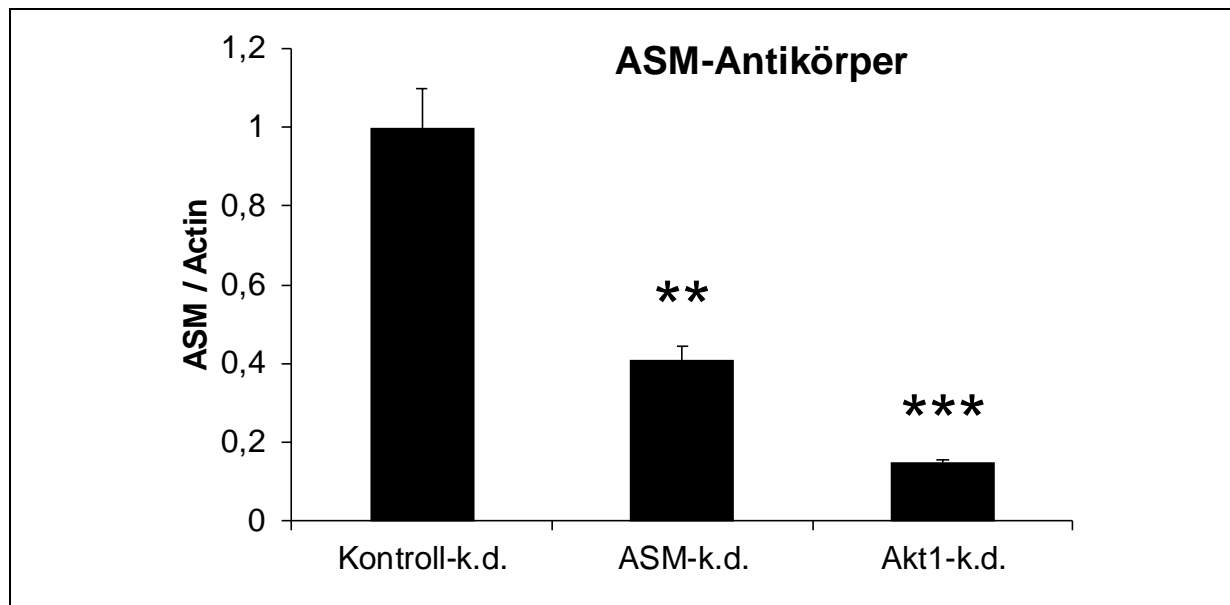


Abbildung 16. Quantifizierung der ASM-Western Blot Farbwerte. Die ASM-Expression war bei den ASM-k.d.-Zellen auf 41 % \pm 4 ($p < 0,01$) und bei den Akt1-k.d.-Zellen auf 15 % \pm 1 ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Kontroll-k.d.-Zellen reduziert. Signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontroll-k.d.-Gruppe mit * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Bei der Proteinkinase B / Akt waren auf den Filmen jeweils zwei Banden ungefähr auf Höhe der 60 kDa-Linie zu erkennen. Hierbei handelte es sich vermutlich um die Akt-1, 2 und 3. Auch dies stimmte mit den Herstellerangaben von 60 kDa überein.

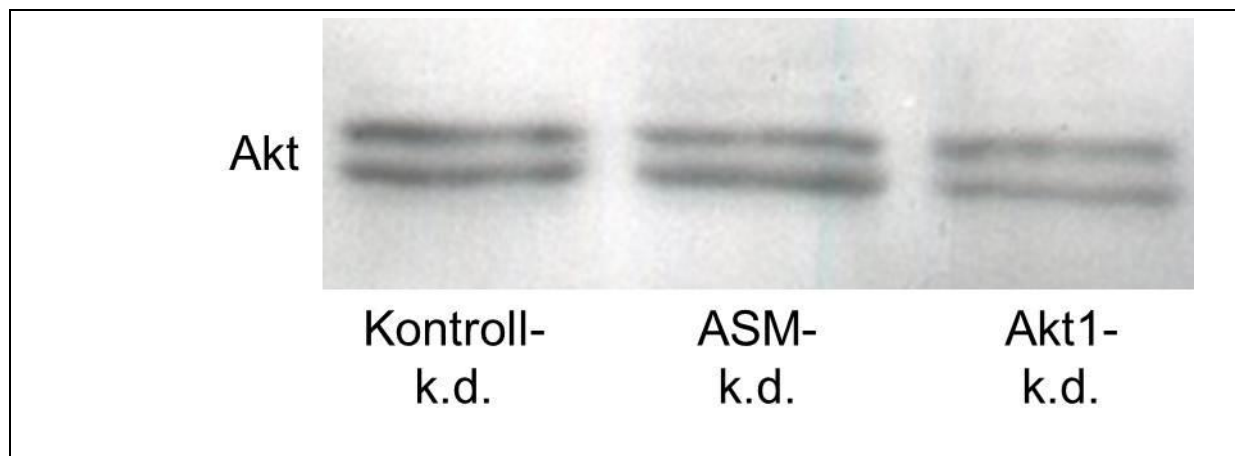
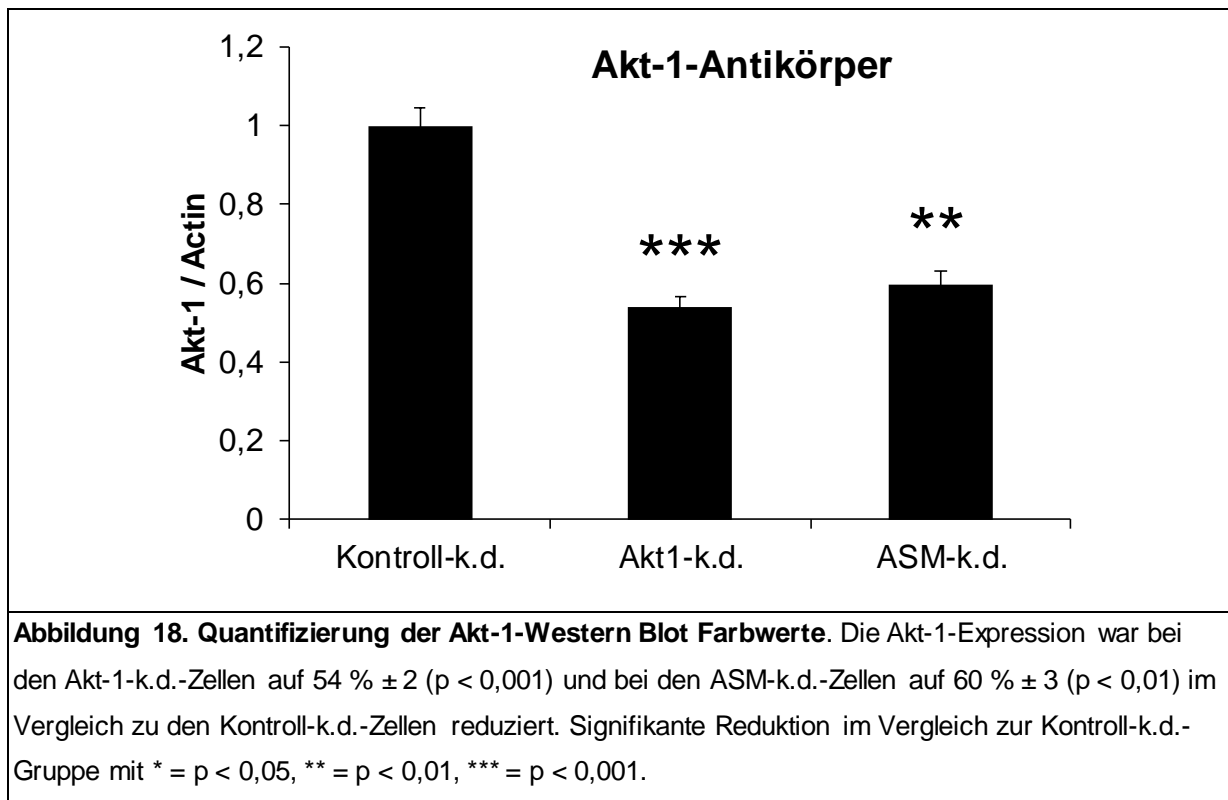


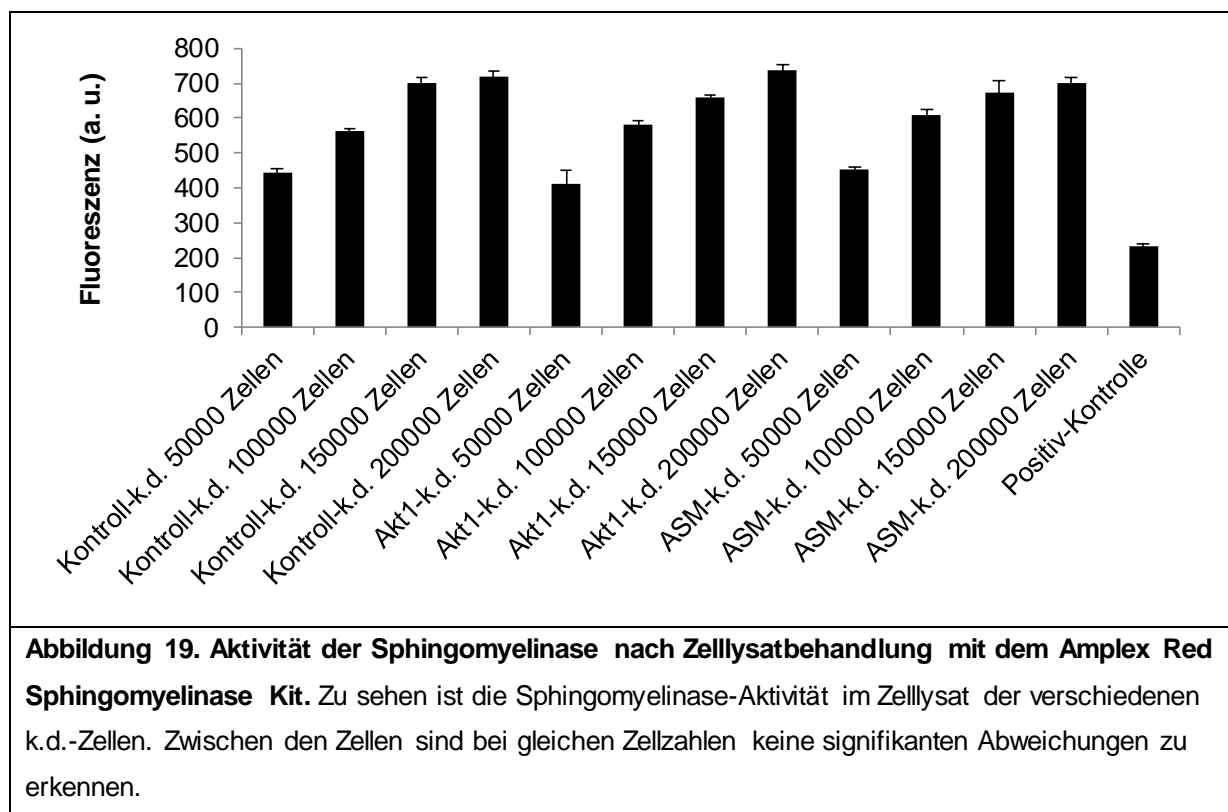
Abbildung 17. Western Blot mit Akt-Antikörper. Exemplarische Darstellung eines Western-Blot-Ergebnisses mit Antikörpern gegen die Proteinkinase B / Akt bei $n = 3$ unabhängig von einander durchgeführten Tests.

Die Farbsättigung reduzierte sich im Vergleich zu den Kontroll-k.d.-Zellen bei den Akt1- k.d. Zellen auf 54 % \pm 2 ($p < 0,001$) und bei den ASM-k.d.-Zellen auf 60 % \pm 3 ($p < 0,01$).



4.5. Sphingomyelinase-Aktivitätstest

Der Assay mit dem Amplex Red Sphingomyelinase Kit zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen k.d.-Zellen auf. Zumindest bei den ASM-k.d.-Zellen wurde eine Verringerung der ASM-Aktivität vermutet. Diese konnte mit diesem Verfahren jedoch nicht bestätigt werden.



4.6. ELISA

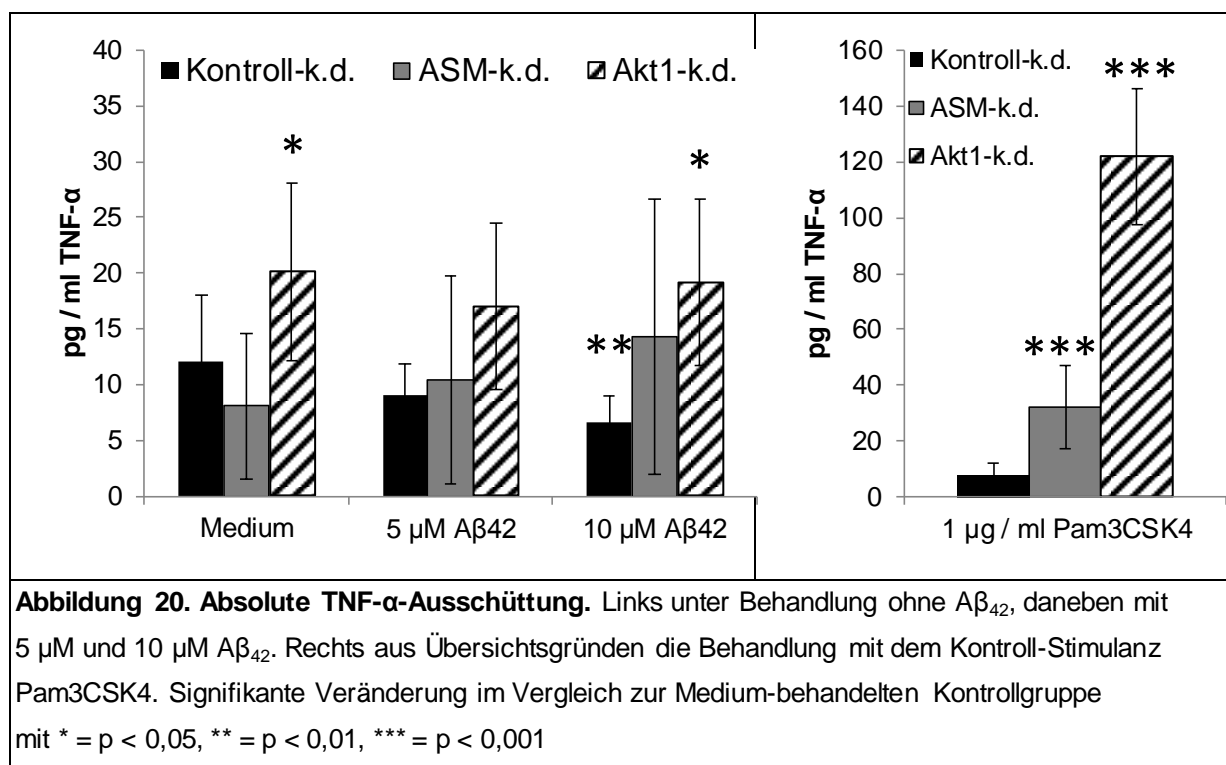
Sowohl beim TNF- α -, als auch beim MCP-1-ELISA wurden die Zellen im Vorfeld mit 5 μ M oder 10 μ M A β ₄₂ stimuliert. Pam3CSK4 diente als Positivkontrolle, Zellmedium ohne Zusatz als Negativkontrolle. Als Bezugspunkt wurden jeweils die Kontroll-k.d.-Zellen gewählt, die nur mit Zellmedium behandelt wurden. Da die Stimulation mit Pam3CSK4 zu sehr hohen Zytokin-Freisetzungen führte, wurden sie in den Grafiken separat dargestellt. Es reichen also geringere Mengen Pam3CSK4 aus, um eine merkbare Zytokinausschüttung zu erreichen.

4.6.1. TNF- α

Die TNF- α -Messungen ergaben bei A β -Stimulation absolute Mittelwerte im niedrigen zweistelligen Pikogramm-Bereich. Eine Stimulation mit A β zeigte bei den ASM-k.d.-Zellen keine signifikanten Veränderungen, wenn auch ein Trend in Richtung verstärkter TNF-Freisetzung zu erkennen war. Ein gegensätzlicher Trend in Richtung verminderter TNF-Ausstoß war zudem bei den Kontroll-k.d.-Zellen mit steigender A β -Konzentration zu messen, welcher im Bereich von 10 μ M A β hoch signifikant war.

Eine Supprimierung von Akt1 erhöhte, mit einer Ausnahme, den TNF- α -Ausstoß signifikant, bemerkenswerter Weise auch in der mit A β -freiem Medium behandelten Kontrollgruppe.

Wurden die Zellen mit Pam3CSK4 behandelt, so erhöhten alle transfizierten Zellen ihren TNF- α -Ausstoß höchst signifikant.

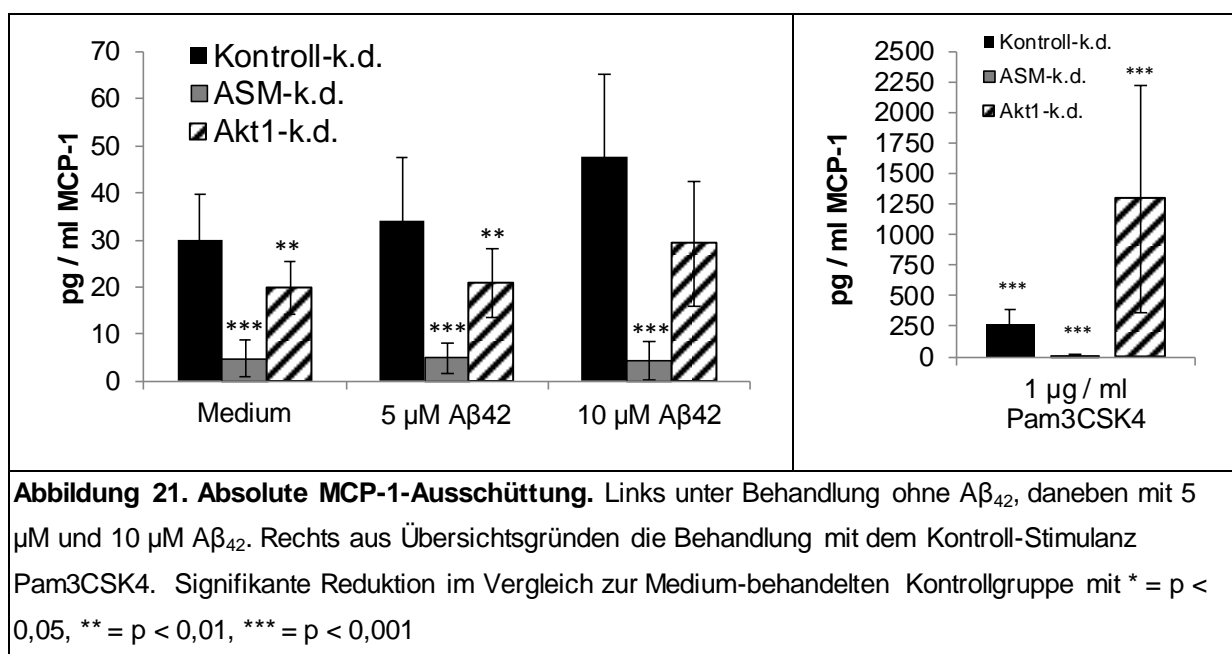


4.6.2. MCP-1

Die Suppression der sauren Sphingomyelinase hatte eine höchst signifikante Reduktion der MCP-1-Freisetzung zur Folge. Dies war auch bei der Behandlung mit Pam3CSK4 so, welches bei den anderen Versuchen zu einer sehr hohen Zytokinfreisetzung führte.

Die Akt1-k.d.-Zellen zeigten unter Medium und 5 μM $\text{A}\beta_{42}$ hoch signifikant reduzierte Werte, welche unter Pam3CSK4 jedoch gegensätzlich höchst signifikant erhöht waren.

Die Kontroll-k.d.-Zellen zeigten mit einer Ausnahme unter $\text{A}\beta$ als auch Pam3CSK4 hoch bis höchst signifikante Erhöhungen ihres MCP-Ausstoßes.



5. Diskussion

5.1. Fragestellung Nr. 1

Gelingt es experimentell in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 die Aktivität der sauren Sphingomyelinase beziehungsweise der Akt / PKB zu reduzieren, um damit den Einfluss dieser Enzyme auf eine spätere Stimulation dieser Zellen mit Alzheimer Amyloid Protein zu studieren?

Zellen und Kontrollstimulanz

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Aktivitäts-Supprimierung der sauren Sphingomyelinase in der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1. Parallel liefen die Versuche mit Zellen reduzierter Akt1-Aktivität, da deren Signalwege sich beeinflussen und über die Akt1 im Bezug auf die Alzheimer-Krankheit wenig bekannt ist. THP-1-Zellen dienten in dieser Arbeit als bewährtes Modell menschlicher primärer Mikroglia und ihrer A β -induzierten entzündlichen Antwort (84) (85) (86) (82) (87).

Als Kontroll-Stimulanz wurde der TLR-1/2-Ligand Pam3CSK4 gewählt. Wenn sowohl Amyloid- β -Protein als auch Pam3CSK4 an Toll-like-Rezeptor 2 binden, so hätte man bei den Ergebnissen der ELISA-Tests ähnliche Tendenzen sehen müssen. Dass dem so war, sah man in der Freisetzung sowohl von TNF- α als auch von MCP-1.

So zeigten bei TNF- α die Kontroll-k.d.-Zellen im Vergleich zur Medium-behandelten Kontrollgruppe eine Reduktion des Proteinausstoßes, bei ASM-k.d. und Akt1-k.d. eine Erhöhung. Dieses Ergebnis ergab sich sowohl bei der Behandlung mit A β , als auch mit Pam3CSK4. Die MCP-1-Ergebnisse waren entsprechend.

Das bedeutet, dass eine Stimulation mit Pam3CSK4 zu einer gleichgerichteten Zytokinausschüttung führt, wie eine Stimulation mit Alzheimer Amyloid Protein. Die in die gleiche Richtung weisenden Ergebnisse der Stimulation mit Pam3CSK4 und die in 2.4. zitierte Literaturen ließen also darauf schließen, dass Pam3CSK4 eine geeignete Kontrollsubstanz war.

Reduktion der ASM- bzw. Akt1-Expression

Um die Expression der sauren Sphingomyelinase und des Akt1-Proteins zu supprimieren wurde in THP-1-Wildtyp-Zellen die in der Einleitung beschriebenen Plasmidvektoren eingebracht und eine stabile Zelllinie etabliert. Um eine erfolgreiche Transfektion zu überprüfen wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Die Plasmidvektoren enthielten die DNA des EmGFP (Emerald Green Fluorescent Protein). Wenn man die Zellen mit Licht einer Wellenlänge von 478 nm anregte, so leuchteten nur grünfarbene Zellen auf, welche das Plasmid in sich aufgenommen haben. Da sowohl bei den Kontroll-k.d.-, Akt1-k.d. als auch bei den ASM-k.d.-Zellen unter Anregung einige Zellen grünfarben aufleuchteten, konnte man davon ausgehen, dass diese die Plasmidvektoren aufgenommen hatten. Das diente lediglich der groben Orientierung, ob überhaupt Plasmide aufgenommen wurden. Es mussten auch noch quantitative Aussagen getroffen werden, wie stark die saure Sphingomyelinase bzw. Akt1 / PKB supprimiert wurden.

Semiquantitativ geschah dies mit Hilfe des Western Blots. Dieser zeigte sowohl unter Aufsicht mit bloßem Auge als auch unter Zuhilfenahme eines Computerprogramms zum Ermitteln der Sättigungswerte eine Reduktion der vermeintlichen Akt- bzw. ASM-Farbbanden der entwickelten Blot-Ergebnisse. Vermeintlich, da der genutzte Akt-Antikörper gegen Akt 1 – 3 gerichtet war. Welche der gezeigten Banden letztlich die Akt1 darstellt ist unklar, sicher konnte man nur sagen, dass auf der Höhe von ca. 60 kDa zwei Banden sichtbar waren. Da der Antikörper relativ spezifisch ist und die Masse der Akt in diesen Bereich fällt, konnte man annehmen, dass es sich bei den gezeigten Banden um die Akt handelt. Die Reduktion der Sättigungswerte um ca. 40 – 50 % ließ auf eine Reduktion der Akt-Menge schließen, was einer Reduktion der Akt-Expression gleichzusetzen ist.

Mit Hilfe der RT-qPCR zeigte sich eine Akt1-Expression der Akt1-k.d.-Zellen von 50 %. Die sowohl optisch sichtbare Reduktion im Western Blot in Kombination mit dem RT-qPCR-Ergebnis sicherten die Vermutungen aufgrund der Fluoreszenzmikroskopie und zeigten eine erfolgreiche Suppression der Akt1-Aktivität auf.

Die RT-qPCR für die ASM-Aktivität erbrachte bei den ASM-k.d.-Zellen eine Restaktivität von ca. 31 %. Neben der Reduktion der Farbsättigung beim Western Blot auf ca. 41 % stand mit dem Amplex® Red Sphingomyelinase-Assay eine andere Methode der Aktivitätsüberprüfung zur Verfügung. Dieser konnte jedoch keine Unterschiede zwischen den k.d.-Zellen aufzeigen. Die Ursache hierfür war unklar. Angenommen werden konnte ja eine ASM-Suppression bei den ASM-k.d.-Zellen. Der Test wurde streng nach Herstellerangaben und mehrfach durchgeführt, das Ergebnis war stets gleich. Bei allen Zellen wurde ein Signal gemessen, welches sich mit steigender Zellzahl erhöhte. Der Test maß also eine ASM-Aktivität. Eine Veränderung beim Sphingomyelinase-Test wäre wünschenswert gewesen, die Kombination aus Fluoreszenzmikroskopie, Western Blot- und RT-qPCR-Ergebnissen ließen dennoch relativ sicher eine erfolgreiche Transfektion und Suppression der ASM-k.d.-Zellen vermuten.

Im ersten Ziel der Arbeit konnte eine erfolgreiche Transfektion der THP-1-Zellen nachgewiesen werden, die gewünschte Suppression konnte bestätigt werden. Es ist demnach möglich, in diesen Zellen die Aktivität der Enzyme saure Sphingomyelinase und Proteinkinase B / Akt experimentell mittels RNAi zu vermindern.

5.2. Fragestellung Nr. 2

Kann durch Verminderung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase eine Veränderung in der Ausschüttung der Zytokine TNF- α und MCP-1 gemessen werden, nachdem die Zellen mit Amyloid- β -Peptid oder dem TLR-Liganden Pam3CSK4 stimuliert wurden?

Das zweite Ziel der Arbeit war herauszufinden, wie sich die Zytokinausschüttung in den transfizierten THP-1-Zellen verhält, wenn diese mit Amyloid- β bzw. Pam3CSK4 in Kontakt kamen.

TNF- α

In diversen Studien wurden in Blutserum, Liquor oder Primärzellen von Alzheimer-Patienten erhöhte TNF- α -Werte gemessen (32) (88). So wurde für diese Arbeit erwartet, dass nach Stimulation mit Amyloid- β oder Pam3CSK4 erhöhte TNF- α -Konzentrationen gemessen werden, und eine Suppression der sauren Sphingomyelinase oder Akt1 eventuell eine Veränderung der Ausschüttung aufzeigen. Mittels ELISA konnten keine signifikanten Unterschiede in der TNF- α -Freisetzung gemessen werden, die Werte bewegten sich im niedrigen zweistelligen Pikogramm-Bereich.

Die unter A β -Stimulation niedrigen TNF- α -Werte lassen sich mit den Ergebnissen anderer Studien vereinbaren, welche ebenfalls mit THP-1-Zellen arbeiteten. Zwar wichen deren Amyloid- β -Konzentrationen von denen dieser Arbeit ab, und einmal wurden andere Amyloid- β -Formen genutzt; bei gleicher Expositionsdauer (24 Stunden) und ohne Kostimulation mit anderen Substanzen wurden trotzdem ähnlich niedrige Werte gemessen (84) (89). Das Ergebnis dieser Studien ist vermutlich auf die hier genutzten A β -Arten und Konzentrationen zu übertragen.

Die Stimulation mit Pam3CSK4 dagegen erbrachte höchst signifikante Veränderungen im Sinne einer gesteigerten TNF- α -Freisetzung. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass A β_{42} unter anderem über Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine Zytokinausschüttung induziert.

Udan zeigte passend hierzu in einer Studie auf, dass A β_{42} sowohl über TLR-2 als auch TLR-4 wirkt. In ihr diente Pam3CSK als alleiniger TLR-2-Ligand, und Lipopolysaccharid als alleiniger TLR-4-Ligand (82).

In einer weiteren Studie wurde eine erhöhte TNF- α -Ausschüttung festgestellt, wenn in ASM-defizienten Primärzellen / in vivo Lipopolysaccharid, also der TLR-4-Ligand, genutzt wurde (90).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die ASM-Aktivität eingeschränkt und diesmal mit Pam3CSK4 stimuliert, das heißt über TLR-2 stimuliert. Dass sich die TNF- α -Werte ebenfalls erhöhten ist im Hinblick auf Udans Studie schlüssig.

Warum sich allerdings keine Veränderung der TNF-Ausschüttung unter Amyloid- β -Stimulation, sprich einer Stimulation von TLR-2 und TLR-4, ergab, ist unklar.

Ein Grund könnte die Zeit sein (24 Stunden), welche die Zellen dem Amyloid- β ausgesetzt waren. So war in anderen Studien unter ähnlichen Bedingungen die TNF-Freisetzung im Zeitverlauf unterschiedlich (89) (91). Es könnte sich also nur um eine Momentaufnahme handeln und zu früheren / späteren Zeitpunkten eine erhöhte TNF-Abgabe messbar sein.

Man kann also sagen, dass THP-1-Zellen nach 24-stündiger A β_{42} -Stimulation keine Veränderung Ihrer TNF- α -Ausschüttung aufweisen. Unter Berücksichtigung der genannten Studien und den eigenen Pam3CSK4-Ergebnissen kann man aber Rozenovas Überlegungen teilen, dass die saure Sphingomyelinase bzw. Ceramid die TNF-Produktion herunterreguliert. Wird sie dagegen gehemmt, kommt es zu einer gesteigerten TNF- α -Freisetzung.

MCP-1

Die Auswirkungen auf die A β -induzierte MCP-1-Ausschüttung waren im Gegensatz zu den TNF- α -Werten deutlich. Die Suppression der sauren Sphingomyelinase führte zu einer hochsignifikanten Reduktion der MCP-1-Ausschüttung, unabhängig davon, ob mit Amyloid- β stimuliert wurde oder nicht. Selbst die Exposition der Kontrollstimulanz Pam3CSK4 erbrachte nur Werte im niedrigen Pikogrammbereich, obwohl Pam3CSK4 in den anderen Versuchen zu sehr hohen Messergebnissen führte. Bei A β - oder Pam3CSK4-Stimulation der Zellen mit normaler ASM-Aktivität waren dagegen erhöhte MCP-1-Werte messbar. Es kann also gesagt werden, dass ohne die saure Sphingomyelinase keine nennenswerte MCP-1-Ausschüttung durch THP-1-Zellen gegeben ist.

5.3. Fragestellung Nr. 3

Kann durch Verminderung der Aktivität der Akt / Proteinkinase B eine Veränderung in der Ausschüttung der Zytokine TNF- α und MCP-1 gemessen werden, nachdem die Zellen mit Amyloid- β -Peptid oder dem TLR-Liganden Pam3CSK4 stimuliert wurden?

TNF- α

Bei Hemmung der Akt1 ist erkennbar, dass die TNF- α -Abgabe stets höher ist als die der Kontroll-k.d.-Zellen. Dies gilt auch für die nur mit Medium behandelten Akt1-k.d.-Zellen. Eine Hemmung von Akt1 führt also zu einer verstärkten TNF- α -Freisetzung. Eine normal funktionierende Akt1 würde also, wie die saure Sphingomyelinase auch, herunterregulierend auf die TNF-Produktion wirken. Bedenkt man, dass die saure Sphingomyelinase eher für den Zelluntergang und Akt1 eher für Zellüberleben- und proliferation steht, ist dieses Ergebnis überraschend. Man hätte zumindest in verschiedene Richtungen weisende Ergebnisse erwarten können.

In wie weit es eine Rolle spielte, dass die ASM-Aktivität der Akt1-k.d.-Zellen ebenfalls signifikant reduziert war (siehe Abbildung 13), bleibt unklar. Metaboliten des Ceramidstoffwechsels können die Proteinkinase B / Akt aktivieren. Eventuell ist so im Umkehrschluss die Reduktion zu erklären (92) (93). Letztlich ist die Interaktion der Signalwegmetaboliten aber sehr komplex und muss in anderen Arbeiten noch näher charakterisiert werden.

MCP-1

Bei Hemmung der Akt1 war die MCP-1-Ausschüttung bei den Medium-behandelten Zellen ebenfalls signifikant reduziert. Unter Stimulation mit A β ₄₂ erhöhten sich die absoluten MCP-1-Werte von diesem Niveau ausgehend. Eine steigende Freisetzung unter Stimulation konnte auch für die Kontroll-Zellen beobachtet werden. Sowohl ohne als auch mit Hemmung der Akt1 kommt es also unter Stimulation zu steigenden MCP-1-Werten. Bei der Kontrollstimulation mit Pam3CSK4 war sogar eine fast 43-fach gesteigerte MCP-1-Menge bei den Akt1-k.d.-Zellen messbar.

Ist die Ausschüttung im Vergleich zu den Kontrollzellen unter A β -Stimulation niedriger als bei den Kontrollzellen, ist sie bei der Stimulation mit Pam3CSK4 um ein Vielfaches höher. Die Interpretation dieses Ergebnisses ist schwer, da Vergleichssituationen aus anderen Studien fehlen. Klar ist, dass bei Akt1-k.d.-Zellen die MCP-1-Abgabe verändert ist. Warum sie einmal niedriger als die Kontrollgruppe ist und einmal höher, ist unklar. Womöglich wird bei der Stimulation mit Pam3CSK4 ein anderer oder zusätzlicher Signalweg eingeschlagen, womöglich erbrächten höhere A β -Konzentrationen ab einem gewissen Zeitpunkt auch höhere MCP-1-Werte als die Kontrollgruppe. Hinzu kommt, wie bei den TNF- α -Werten, die Zeitkomponente und die Tatsache, dass bei den Ergebnissen der RT-qPCR die Aktivität der sauren Sphingomyelinase in den Akt1-k.d.-Zellen auf 43 % Restaktivität reduziert war (siehe Abbildung 13). In wie weit also die Veränderungen durch eine veränderte ASM-Aktivität zustande kamen, ist unklar.

Schon zur Frage, in wie weit Amyloid- β überhaupt die Akt1 stimuliert (94) oder supprimiert (95), herrscht in verschiedenen Studien Uneinigkeit. Auch wenn die Proteinkinase B / Akt einen wichtigen Stellenwert in verschiedenen Signalwegen zu haben scheint, steht die Forschung auf diesem Gebiet noch am Anfang.

Methodenkritik: Als Stimulationszeitraum wurde eine Zeit von 24 Stunden gewählt. In dieser Phase waren die Zellen A β_{42} oder Pam3CSK4 ausgesetzt. Im Nachhinein wäre eine Zeitreihe wünschenswert gewesen, da man nicht weiß, wie sich die Ausschüttung kurz nach Stimulation und nach mehreren Tagen verhält. Da es sich bei Alzheimer um eine chronische Erkrankung handelt, wäre eine Inkubation über einen längeren Zeitraum, zumindest über mehrere Tage, interessant gewesen. Weiter wurden als Entzündungsmarker TNF- α und MCP-1 gewählt. Im Nachhinein wäre ein breiteres Spektrum an Markern wie z. B. IL-1, IL-6, IFN- γ etc. wünschenswert gewesen, um eine bessere Aussage bezüglich etwaiger Veränderungen bei ASM- oder Akt1-Suppression treffen zu können.

5.4. Schlussfolgerung

Zusammenfassend können folgende wichtige Erkenntnisse bezüglich der Zytokinausschüttung durch ASM und Akt-1 festgehalten werden:

1. Sowohl die saure Sphingomyelinase als auch Akt / PKB scheinen die TNF- α -Produktion zu reduzieren.
2. Für die Freisetzung von MCP-1 wird die saure Sphingomyelinase benötigt.
3. Eine Reduktion der Akt1-Aktivität führt in der gleichen Zelle zu einer signifikanten Reduktion der ASM-Aktivität. Die Ursache ist unbekannt, eine Interpretation der Akt1-Werte wird dadurch erschwert.
4. Pam3CSK4 führt in Akt1-k.d.-Zellen zu erheblich erhöhten MCP-1-Werten. Bei Stimulation mit A β finden sich keine Unterschiede. Pam3CSK4 hat also entweder andere Signalwege, oder aber das Ergebnis ist auf eine zu geringe A β -Menge zurückzuführen.

Veränderungen in der Zytokinausschüttung in Bezug auf die Alzheimer-Krankheit sind schwer zu interpretieren, zumal noch nicht einmal die genaue Rolle von Amyloid- β in der Pathogenese verstanden ist. Ob die gefunden Zeichen der Neuroinflammation günstig oder schlecht für die Progression der Alzheimer Krankheit sind, ist ebenfalls offen. Eine Deutung veränderter TNF- α - oder MCP-1-Werte nach A β -Stimulation ist also unter diesen Gesichtspunkten gegenwärtig noch Spekulation. Als Beispiel kann TNF- α genommen werden, das zwar in Alzheimerpatienten eine entzündliche Veränderung bewirkt bzw. Hinweis für diese ist, TNF- α aber je nach Studie zum Zellsterben führt, die Kommunikation zwischen Nervenzellen regelt, oder aber sogar Nervenzellen vor dem Untergang schützt (96). Dass die gleichen Moleküle sowohl Zellprotektion als auch Destruktion bewirken, zeigt, dass die Regulierung sehr komplex ist und Werte im Kontext gesehen werden müssen.

Um die Rolle von TNF- α und MCP-1 weiter zu charakterisieren sollten die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse noch in Versuchen mit Primärzellen und in vivo überprüft werden. Im Hinblick auf die sich verändernde Bevölkerungsstruktur und damit steigende Alzheimer-Fallzahlen ist es wichtig, weiter intensiv an diesem Thema zu forschen. So können dann irgendwann die genauen Pathomechanismen verstanden, und wirksam gegen die Alzheimer-Krankheit vorgegangen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information.** *Internet:* <http://www.dimdi.de>. 2010.
2. **Wallesch, CW et al.** *Demenzen*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2005. ISBN 3-13-136911-6.
3. **Xie, J et al.** Survival times in people with dementia: analysis from population based cohort study with 14 year follow-up. *BMJ*. 2008, Bd. 336, 7638:258 - 62.
4. **Ferri, CP et al.** Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005, Bd. 366, 9503:2112 - 7.
5. **Ziegler U, Doblhammer G.** Prevalence and incidence of dementia in Germany--a study based on data from the public sick funds in 2002. *Gesundheitswesen*. 2009, Bd. 71, 5:281-90.
6. **Qiu C, De Ronchi D, Fratiglioni L.** The epidemiology of the dementias: an update. *Curr Opin Psychiatry*. 2007, Bd. 20, 4:380 - 5.
7. **Weyerer, S.** *Heft 28 - Altersdemenz*. Berlin : Robert-Koch-Institut, 2005. ISBN 3-89606-162-3.
8. **Statistisches Bundesamt.** Bevölkerung Deutschlands bis 2060; 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. Wiesbaden 2009.
9. —. *Gesundheit - Krankheitskosten 2002, 2004 und 2006*. Wiesbaden 2008.
10. **Arnold, SE et al.** The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*. 1991, Bd. 1, 1:103 - 16.
11. **Maslah, E et al.** Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*. 2001, Bd. 56, 1:127 - 9.
12. **Whitehouse, PJ et al.** Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 1982, Bd. 215, 4537:1237 - 9.
13. **Davies, P et al.** Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *The Lancet*. 1976, Bd. 2, 8000:1403.
14. **DeKosky, ST et al.** Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*. 1990, Bd. 27, 5:457 - 64.
15. **Kang, J et al.** The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987, Bd. 325, 6106:733 - 6.
16. **Selkoe, DJ.** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001, Bd. 81, 2:741 - 66.
17. **Haass, C et al.** Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 1992, Bd. 359, 6393:269 - 9.

18. **Iwatsubo, T et al.** Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994, Bd. 13, 1:45 - 53.
19. **Irie, K et al.** Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng*. 2005, Bd. 99, 5:437 - 47.
20. **Shoji, M et al.** Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*. 1992, Bd. 258, 5079:126 - 9.
21. **Mattson, MP.** Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*. 1997, Bd. 77, 4:1081 - 132.
22. **Iwata, N et al.** Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science*. 2001, Bd. 292, 5521:1550 - 2.
23. **Miller, BC et al.** Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, Bd. 100, 10:6221 - 6.
24. **Näslund, J et al.** Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*. 2000, Bd. 283, 12:1615 - 7.
25. **Weingarten, MD et al.** A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975, Bd. 72, 5:1858 - 62.
26. **Mandelkow, EM et al.** Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*. 1998, Bd. 8, 11:425 - 7.
27. **Brodal, P.** *The Central Nervous System: Structure and Function*. Oxford : University Press, 2003. ISBN 0195165608.
28. **Lee, VM et al.** Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci*. 2001, Bd. 24, 1121 - 59.
29. **Pschyrembel, W.** *Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage*. Berlin : Walter de Gruyter & Co., 1989. ISBN 3-11-010881-X.
30. **Shen, Y et al.** Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001, Bd. 305, 3:165 - 8.
31. **Rogers, J et al.** Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, Bd. 89, 21:10016 - 20.
32. **Akiyama, H et al.** Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000, Bd. 21, 3:383 - 421.
33. —. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2000, Bd. 14, 1:47 - 53.
34. **Gate, D et al.** Macrophages in Alzheimer's disease: the blood-borne identity. *J Neural Transm*. 2010, Bd. 117, 8:961 - 970.
35. **Ransohoff, RM et al.** Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immuno*. 2009, 27:119 - 45.
36. **Graeber, MB et al.** Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010, Bd. 119, 1:89 - 105.

37. **Stellwagen, D et al.** Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*. 2006, Bd. 440, 7087:1054 - 9.
38. **Blasko, I et al.** Costimulatory effects of interferon- γ and interleukin-1 β or tumor necrosis factor α on the synthesis of Abeta1-40 and Abeta1-42 by human astrocytes. *Neurobiol Dis*. 2000, Bd. 6, 682 - 9.
39. **Bales, KR et al.** The NF- κ B/Rel family of proteins mediates Abeta-induced neurotoxicity and glial activation. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998, Bd. 57, 1:63 - 72.
40. **Barna, BP et al.** Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J Neuroimmunol*. 50, 1994, 1:101 - 7.
41. **van Coillie, E et al.** The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1999, Bd. 10, 1:61 - 86.
42. **Deshmane, SL et al.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 29, 2009, 6:313 - 26.
43. **Gunn, MD et al.** Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J Immunol*. 1997, Bd. 158, 1:376 - 83.
44. **Ishizuka, K et al.** Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci*. 1997, Bd. 51, 3:135 - 8.
45. **Galimberti, D et al.** Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol*. 2003, Bd. 53, 4:547 - 8.
46. **Naert, G et al.** CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 31, 2011, 16:6208-20.
47. **Galimberti, D et al.** Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2006, Bd. 63, 4:538 - 43.
48. **Kozuki, M et al.** Atorvastatin and pitavastatin protect cerebellar Purkinje cells in AD model mice and preserve the cytokines MCP-1 and TNF- α . *Brain Res*. 1388:32-8, 2011.
49. **Bickels, J et al.** Coley's toxin: historical perspective. *Isr Med Assoc J*. 2002, Bd. 4, 6:471 - 2.
50. **Carswell, EA et al.** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975, Bd. 72, 9:3666 - 70.
51. **Hehlgans, T et al.** The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005, Bd. 115, 1:1 - 20.
52. **Singer, SJ et al.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972, Bd. 175, 23:720 - 31.

53. **Simons, K et al.** Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997, Bd. 387, 6633:569 - 72.
54. **Saltiel, AR et al.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001, Bd. 414, 6865:799 - 806.
55. **Pohl, J et al.** Long-chain fatty acid uptake into adipocytes depends on lipid raft function. *Biochemistry*. 2004, Bd. 43, 14:4179 - 87.
56. **Zeng, Y et al.** Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J Biol Chem*. 2003, Bd. 278, 46:45931 - 6.
57. **Gajate, C et al.** The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood*. 2001, Bd. 98, 13:3860 - 3.
58. **Popik, W et al.** Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol*. 2002, Bd. 76, 10:4709 - 22.
59. **Pike, LJ.** Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*. 2006, Bd. 47, 7:1597 - 8.
60. **Simons, M et al.** Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, Bd. 95, 11:6460 - 4.
61. **Riddell, DR et al.** Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol*. 2001, Bd. 11, 16:1288 - 93.
62. **Ehehalt, R et al.** Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*. 2003, Bd. 160, 1:113 - 23.
63. **Ogretmen, H et al.** Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004, Bd. 4, 8:604 - 16.
64. **Pavione, C et al.** Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res*. 2009, Bd. 82, 2:175 - 83.
65. **Samet, T et al.** Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells. *Chem Phys Lipids*. 1999, Bd. 102, 1 - 2:65 - 77.
66. **Grassmé, H et al.** CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem*. 2001, Bd. 276, 23:20589 - 96.
67. **Smith, EL et al.** The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J*. 2008, Bd. 22, 10:3419 - 31.
68. **Chiantia, S et al.** Raft domain reorganization driven by short- and long-chain ceramide: a combined AFM and FCS study. *Langmuir*. 2007, Bd. 23, 14:7659 - 65.
69. **Kirschnek, S et al.** CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase. *J Biol Chem*. 2000, Bd. 275, 35:27316 - 23.
70. **Grassmé, H et al.** Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol*. 2002, Bd. 168, 1:298 - 307.

71. —. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med.* 2003, Bd. 9, 3:322 - 30.
72. **Esen, M et al.** Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis.* 2001, Bd. 6, 6:431 - 9.
73. **Charruyer, A et al.** UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J Biol Chem.* 2005, Bd. 280, 19:19196 - 204.
74. **Santana, P et al.** Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell.* 1996, Bd. 86, 2:189 - 99.
75. **Truman, JP et al.** Acid sphingomyelinase in macrophage biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:3293-3305, 2011.
76. **Vivanco, I et al.** The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002, Bd. 2, 7:489 - 501.
77. **New, DC et al.** G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *FEBS J.* 2007, Bd. 274, 23:6025 - 36.
78. **Engelman, JA et al.** The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006, Bd. 7, 8:606 - 19.
79. **Brunet, A et al.** Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.* 2001, Bd. 11, 3:297 - 305.
80. **Bourbon, NA et al.** Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C ζ : implications for growth arrest. *J Biol Chem.* 2002, Bd. 277, 5:3286 - 92.
81. **Zhou, H et al.** Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1998, Bd. 273, 26:16568 - 75.
82. **Udan, ML et al.** Toll-like receptors 2 and 4 mediate A β (1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurosci.* 2008, Bd. 104, 2:524 - 33.
83. **Jana, M et al.** Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *J Immunol.* 2008, Bd. 181, 10:7254 - 62.
84. **Klegeris, A et al.** Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide with the human monocytic cell line THP-1 results in a protein kinase C-dependent secretion of tumor necrosis factor- α . *Brain Res.* 1997, Bd. 747, 1:114 - 21.
85. **Yates, SL et al.** Amyloid beta and amylin fibrils induce increases in proinflammatory cytokine and chemokine production by THP-1 cells and murine microglia. *J Neurochem.* 2000, Bd. 74, 3:1017 - 25.
86. **Combs, CK et al.** beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2001, Bd. 21, 4:1179 - 88.

87. **Bamberger, ME et al.** A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci.* 2003, Bd. 23, 7:2665 - 74.
88. **Tarkowski, E et al.** Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol.* 1999, Bd. 19, 4:223 - 30.
89. **Ajit, D et al.** Amyloid-beta(1-42) fibrillar precursors are optimal for inducing tumor necrosis factor-alpha production in the THP-1 human monocytic cell line. *Biochemistry.* 2009, Bd. 48, 38:9011 - 21.
90. **Rozenova, KA et al.** Studies on the role of acid sphingomyelinase and ceramide in the regulation of TACE activity and TNF{alpha} secretion in macrophages. *J Biol Chem.* 2010, Bd. Epub ahead of print.
91. **Viel, JJ et al.** Age- and concentration-dependent neuroprotection and toxicity by TNF in cortical neurons from beta-amyloid. *J Neurosci Res.* 2001, Bd. 64, 5:454 - 65.
92. **Gangoiti, P et al.** Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cell Signal.* 2008, Bd. 20, 4:726 - 36.
93. **Gómez-Muñoz, A et al.** Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett.* 2005, Bd. 579, 17:3744 - 50.
94. **Ma, R et al.** Erythropoietin protects PC12 cells from beta-amyloid(25-35)-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Neuropharmacology.* 56, 2009, 6-7:1027 - 34.
95. **Abbott, JJ et al.** Abeta(1-42) modulation of Akt phosphorylation via alpha7 nAChR and NMDA receptors. *Neurobiol Aging.* 29, 2008, 7:992 - 1001.
96. **Wyss-Coray, T.** Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med.* 2006, Bd. 12, 9:1005 - 15.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Demenzprävalenz (in Prozent) in den GKV-Daten für das Jahr 2002 und in verschiedenen Meta-Studien. Aus: Ziegler und Doblhammer; Prävalenz und Inzidenz von Demenz in Deutschland - Eine Studie auf Basis von Daten der GKV von 2002; Rostocker Zentrum zur Erforschung des Demografischen Wandels; 2009	5
Abbildung 2. APP-Prozessierung.	7
Abbildung 3. Ausschnitt aus dem Sphingolipid-Stoffwechsel. Modifiziert nach Ogretmen und Hannun (63).	12
Abbildung 4. Sphingomyelinspaltung durch die saure Sphingomyelinase ASM. Aus: Smith, EL et al. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. FASEB J. 2008, Bd. 22, 10:3419 - 31.	13
Abbildung 5. Auslösen einer Signalkaskade durch Veränderung der Zellmembran.	14
Abbildung 6. RNA-Interferenz.	21
Abbildung 7: Invitrogen, BLOCK-iT™ Pol II miR Validated miRNA Vector DuoPaks, 2005	22
Abbildung 8. Insertionskontrolle Plasmidvektoren.	32
Abbildung 9. Fluoreszenzmikroskopie Wildtype-Zellen.	33
Abbildung 10. Fluoreszenzmikroskopie Kontroll-k.d.	33
Abbildung 11. Fluoreszenzmikroskopie ASM-k.d.	34
Abbildung 12. Fluoreszenzmikroskopie Akt1-k.d.	34
Abbildung 13. RT-qPCR-Ergebnis ASM-Expression.	35
Abbildung 14. RT-qPCR-Ergebnis Akt1-Expression.	36
Abbildung 15. Western Blot mit ASM-Antikörper.	37
Abbildung 16. Quantifizierung der ASM-Western Blot Farbwerte.	38
Abbildung 17. Western Blot mit Akt-Antikörper.	38
Abbildung 18. Quantifizierung der Akt-1-Western Blot Farbwerte.	39
Abbildung 19. Aktivität der Sphingomyelinase nach Zelllysatzbehandlung mit dem Amplex Red Sphingomyelinase Kit.	40
Abbildung 20. Absolute TNF- α -Ausschüttung.	41
Abbildung 21. Absolute MCP-1-Ausschüttung.	42